



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO.

MAESTRIA EN CIENCIAS DE LA
PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

ESTUDIO DEL VIRUS DE ARTRITIS ENCEFALITIS
CAPRINA EN GLÁNDULAS ACCESORIAS DEL
APARATO REPRODUCTOR DE
MACHOS CAPRINOS

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA:

GERARDO ARCILA LÓPEZ TELLO

Tutor:
Dr. Jorge Tórtora Pérez.

Comité Tutorial:
Dr. Álvaro Aguilar Setién.
Dr. Humberto Alejandro Martínez Rodríguez.



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.

Resumen.

Se evaluó la presencia del Virus de Artritis Encefalitis Caprina (VAEC) en células de las glándulas accesorias (Vesícula Seminal, Glándulas Bulbouretrales y Ámpulas) de machos caprinos, para lo cual se obtuvieron muestras de glándulas accesorias de 7 animales infectados naturalmente, 3 animales infectados con una cepa de referencia ATCC, 3 animales infectados con un aislado en FESC y 3 animales seronegativos a una prueba de ELISA Indirecta; así mismo se realizaron cultivos celulares primarios a partir de glándulas fetales para su infección *in vitro*, éstas fueron procesadas con las técnica de inmunohistoquímica e hibridación *in Situ*. Los cultivos infectados resultaron positivos a la expresión del antígeno y al ADN proviral. Se detectó el provirus en 10/16 muestras de Vesícula Seminal, 8/16 de Glándulas Bulbouretrales y 8/16 de Ámpula. En los animales infectados se observó señal de hibridación a nivel nuclear en las células epiteliales.

De los fetos colectados para cultivos celulares se evaluó si estos pueden establecer una respuesta de anticuerpos contra Lentivirus de Pequeños Rumiantes, para lo cual se obtuvo el suero y fue probado mediante un ELISA indirecto, detectándose anticuerpos en 5 fetos caprinos de 80 días de gestación y en 4 fetos ovinos de 90 a 100 días de gestación; 3 fetos caprinos y 2 ovinos de 60 a 65 días de gestación resultaron sospechosos.

Se detecto la presencia del virus de artritis encefalitis caprina en las células epiteliales de las glándulas estudiadas, esto puede significar que tengan la función de ser un reservorio del virus, además de que el liquido seminal producido por ellas contenga partículas virales infectadas, pudiendo entonces diseminar la enfermedad por vía venérea.

Se detecto la presencia de anticuerpos contra el virus de artritis encefalitis caprina en fetos, lo cual indica que estos pudieron estar en contacto con antígenos virales durante la gestación, por lo cual es posible que exista transmisión intrauterina, sin embargo se requieren mas estudios a este respecto.

Índice.

1.0 Introducción.....	6
1.1 Etiología.....	7
1.2 Susceptibilidad de especie.....	11
1.3 Transmisión.....	12
1.4 Patogénia.....	15
1.5 Características clínicas.....	17
1.6 Respuesta inmune.....	19
1.7 Diagnóstico.....	20
1.8 Prevención y Control.....	23
2.0 Hipótesis.....	25
3.0 Objetivos.....	25
3.1 Objetivo general.....	25
3.2 Objetivos particulares.....	25
4.0 Material y Métodos.....	26
4.1 Estudio <i>In Vitro</i>	26
4.2 Estudio en muestras animales.....	28
4.3 Serología fetal.....	30
5.0 Resultados.....	31
5.1 Estudio <i>In Vitro</i>	31
5.2 Estudio en muestras animales.....	35
5.3 Serología fetal.....	39
6.0 Discusión.....	40
7.0 Conclusiones.....	47
8.0 Referencias bibliográficas.....	48

Índice de Figuras.

Figura 1. Esquema de la estructura del VAEC.....	7
Figura 2. Organización genómica del VAEC.....	9
Figura 3. Estructura del provirus y sus productos de transcripción y traducción.....	11
Figura 4. Efecto de caballo de Troya del AEC.....	15
Figura 5. Ciclo de replicación del VAEC.....	17
Figura 6. Cultivos celulares de glándulas accesorias.....	31
Figura 7. Efecto citopático en cultivos celulares de glándulas accesorias.....	32
Figura 8. Técnica inmunohistoquímica en cultivos celulares de glándulas accesorias..	33
Figura 9. Hibridación <i>in situ</i> en cultivos celulares de glándulas accesorias.	34
Figura 10. Resultados de Hibridación <i>in situ</i> en vesícula seminal.....	36
Figura 11. Resultados de Hibridación <i>in situ</i> en glándula bulbouretral.....	37
Figura 12. Resultados de Hibridación <i>in situ</i> en ampulla.....	38

Índice de Tablas.

Tabla 1. Propuesta de clasificación de los LvPR.....	12
Tabla 2. Número de Muestras de glándulas accesorias positivas a la hibridación <i>in situ</i> ..	35

Índice de gráficas.

Grafica 1. Número de sueros fetales positivos y sospechosos distribuidos por días de gestación	39
--	----

1.0 Introducción.

La Artritis Encefalitis Caprina (AEC) fue descrita por primera vez en 1974 como un síndrome de meningoencefalitis en cabritos menores de 4 meses de edad (Cork *et al.*, 1974); pero no fue sino hasta 1979 cuando se aisló el virus en rebaños con los mismos problemas nerviosos con la presencia de artritis, y se le dio su denominación de Virus de Artritis Encefalitis Caprina (VAEC) (Crawford *et al.*, 1980; Adams *et al.*, 1980). En México el primer aislamiento del VAEC se reportó en 1986, aunque ya existían estudios serológicos (Nazara *et al.*, 1983; Nazara *et al.*, 1985). La enfermedad ocasiona considerables pérdidas económicas en la industria caprina y su distribución es mundial (Baba *et al.*, 2000). La prevalencia de la infección, aún sin signos clínicos, varía ampliamente y puede alcanzar el 80 % en hatos grandes, pero la cifra promedio es de 25 %. En México, estudios serológicos reportan seroprevalencia en un rango de 17% a 35% en cabras importadas, así como la descripción de casos clínicos (Gay *et al.*, 1986; Daltabuit *et al.*, 1999).

Se trata de una enfermedad infecciosa persistente de distribución mundial que causa lesiones inflamatorias progresivas que afectan principalmente articulaciones, pulmones, glándula mamaria y sistema nervioso central. La mayoría de los animales infectados permanecen asintomáticos por toda su vida, sin embargo pueden excretar el virus contaminando el medio ambiente. Por lo tanto, es de mayor importancia el estatus infeccioso del animal que la presentación de los signos clínicos, y representa un elemento crucial en el diseño de programas de prevención y control de la enfermedad (Grossi *et al.* 2005).

Existe consenso general de que las consecuencias económicas pueden ser significativas, sin embargo los datos que sostienen esta afirmación son incompletos y en algunos casos contradictorios. La principal causa de esta situación radica en la compleja relación que existe entre el virus y el hospedador, además de los efectos que tiene el manejo sobre la presentación de la enfermedad (Peterhans *et al.* 2004).

Actualmente la AEC se encuentra enlistada en el Grupo 3 de enfermedades, plagas exóticas y enzoóticas de notificación obligatoria en los Estados Unidos Mexicanos (Diario Oficial, 5 Marzo de 1999).

1.1 Etiología.

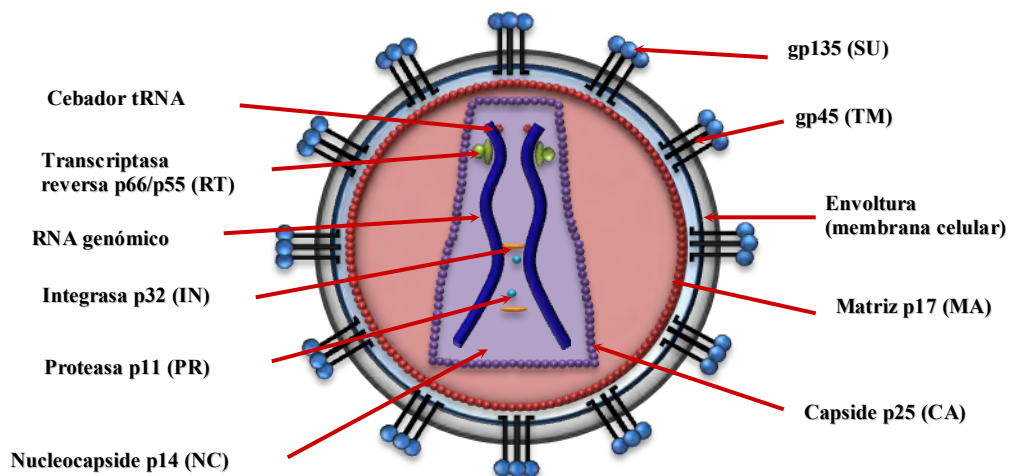
1.1.1 Clasificación.

El virus de Artritis Encefalitis Caprina (VAEC) es un lentivirus de la familia *Retroviridae*, subfamilia *Orthoretrovirinae*, la cual incluye virus que mayoritariamente causan enfermedades crónicas multisistémicas que se pueden manifestar meses o años después de la infección. Se ha propuesto que los lentivirus son los más complejos de los retrovirus, ya que codifican proteínas reguladoras de la replicación viral, producto de transcritos derivados de ARN mensajero policistrónicos (Saltarelli *et al.*, 1994).

1.1.2 Morfología.

El VAEC es un virión con envoltura, ligeramente pleomórfico, de 80 a 100 nm de diámetro, presenta pequeñas proyecciones en la envoltura distribuidas regularmente. Tiene una nucleocápside isométrica ligeramente cónica (Robinson *et al.*, 1986., ICTV 2005). La estructura del VAEC se esquematiza en la figura 1.

Figura 1.- Esquema de la estructura del Virus de Artritis Encefalitis Caprina.



1.1.3 Propiedades fisicoquímicas.

Presenta una densidad buoyante de 1.16 a 1.18 g/cm³ en sucrosa; es sensible al calor, detergentes y formaldehído. Su infectividad no se ve afectada por radiaciones ultravioleta. Contiene 35% de lípidos, 3% de carbohidratos y 2% de ácido nucleico (ICTV., 2005).

1.1.4 Ácido nucleico.

El ácido nucleico de los retrovirus es único entre los virus en varios aspectos, incluyendo su estructura física, sus síntesis y sus funciones durante la replicación. Se trata del único genoma de ARN diploide, es decir esta compuesto por dos cadenas idénticas de ARN monocatenario, es el único sintetizado y procesado por la maquinaria celular que procesa los ARN mensajeros de la célula infectada; es el único asociado con un ARN cuya función es iniciar la replicación y el único ARN genómico de sentido positivo que no tiene función de mensajero en las etapas tempranas de la replicación (Freed *et al.*, 2006).

El ARN de sentido positivo tiene 9189 nucleótidos. Este ARN genómico es encapuchado con una secuencia m⁷G5'ppp5'G_mp que tiene la función de un cebador tARN poliadenilado (Fields *et al.*, 1991; ICTV., 2005).

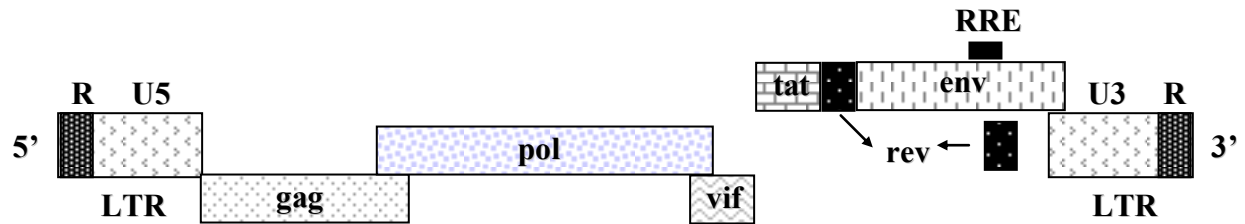
El virión contiene 2 copias del ARN genómico, esta característica se encuentra en todos los retrovirus pero su función no es clara, ya que no es indispensable para la transcripción reversa del genoma viral; sin embargo, se ha especulado que ya que el índice de error de la transcriptasa reversa es tan alto, funciona como amortiguador biológico contra mutaciones demasiado rápidas durante las etapas iniciales de la infección (Greatorex., 2004; Freed *et al.*, 2006).

1.1.5 Organización genómica.

La organización genómica del VAEC es compleja. El extremo 5' comienza con una región pequeña llamada R, seguida de una secuencia única llamada U5, mientras que en el extremo 3' hay una secuencia única U3, seguida por una región R. La región R contiene la señal y el sitio de unión de una secuencia poliadenilada terminal. Al darse la transcripción reversa, estas regiones codifican también las denominadas repeticiones de terminación largas o LTR por sus siglas en inglés, cuyas funciones son promover la transcripción del RNA mensajero viral, además de servir como señal de poliadenilación y terminación (Saltarelli *et al.*, 1994, Kalinski *et al.*, 1991). El genoma contiene 3 genes estructurales principales: *gag* que codifica las proteínas de matriz, cápside y nucleocápside; *pol* que codifica las enzimas transcriptasa reversa, dUTPasa, integrasa y proteasa; *env* que codifica las proteínas de envoltura. Adicionalmente el VAEC codifica varios genes reguladores: *Rev* regula la expresión de los genes estructurales, al transportar los RNA mensajeros de estos al

citoplasma; *Tat* tiene una función transactivadora que estimula la expresión de los LTR y *Vif* regula la adición de glicoproteínas al virión, además de compensar la falta de factores celulares que participen en el ensamble de la partícula viral (Saltarelli *et al.* 1994., Schoborg 2002., Abelson *et al.* 2002., Harmache *et al.* 1995). Ver figura 2.

Figura 2.- Organización genómica del Virus de Artritis Encefalitis Caprina.



- LTR.- Repeticiones de terminación larga.
- gag.- gen que codifica proteínas de matriz, cápside y nucleocápside.
- pol.- gen que codifica enzimas transcriptasa reversa, dUTPasa, integrasa y proteasa.
- vif.- gen que codifica el factor de infectividad viral.
- tat.- gen que codifica un factor transactivador.
- rev.- gen regulador de la expresión del genoma viral.
- env.- gen que codifica proteínas de envoltura.
- RRE.- gen que codifica el elemento de respuesta de rev.

1.1.6 Proteínas.

1.1.6a Proteínas Estructurales.

1.- Codificadas por el gen *env*.

El virión contiene una envoltura con proteínas codificadas por el gen *env*. Estas proteínas son importantes en el reconocimiento del receptor, son la glicoproteína de superficie (SU; gp135) y la transmembranal (TM; gp45), ambas sintetizadas como un precursor y cortadas por proteasas celulares (Valas *et al.*, 2000; Fields *et al.*, 1991).

2.-Codificadas por el gen *gag*.

La proteína de matriz (MA; p17) asegura la unión entre la cápside y la envoltura. La proteína de cápside (CA; p25) es la más abundante proteína del virión, forma el núcleo hidrofóbico del virión y genera una fuerte respuesta de anticuerpos durante la infección. La proteína de nucleocápside (NC; p14) asegura la estabilidad de la nucleocápside y del ARN viral. Estas tres proteínas son codificadas a partir del gen *gag*, transcribiéndose un precursor denominado Pr55gag, el cual es cortado por la proteasa viral (Fields *et al.*, 1991).

1.1.6b Proteínas no estructurales.

Son codificadas por el gen *pol*. Comprenden las enzimas necesarias para la replicación viral.

1.- Transcriptasa reversa (RT). Es la enzima clave en la replicación viral, se considera una ADN polimerasa dependiente de ARN. Proceso único en la naturaleza. Transcribe una cadena doble de ADN a partir de una cadena de ARN, además de tener actividad de ribonucleasa H (Hizi *et al.*, 2008).

2.- Integrasa (IN). Después de la retrotranscripción, el provirus migra hacia el núcleo, el genoma viral es integrado entonces en el ADN de la célula hospedadora, mediado por esta enzima. Aquí se involucran las secuencias repetidas invertidas presentes en las LTRs (Wagner *et al.*, 1999).

3.- dUTPasa. Ayudan a mantener una baja proporción de dUTP a TTP, minimizan la incorporación de uracilos dentro del ADN. Efecto útil durante la replicación en células que no se dividen. Además aparentemente disminuye la frecuencia de mutaciones de G a A *in vivo* (Turelli *et al.*, 1997).

4.- Proteasa (PR). Divide el precursor gag y la poliproteína de gag-pol y reensambla las proteasas de ácido aspártico celular en su estructura tridimensional (Fields *et al.*, 1991).

1.1.6c Proteínas codificadas por genes auxiliares.

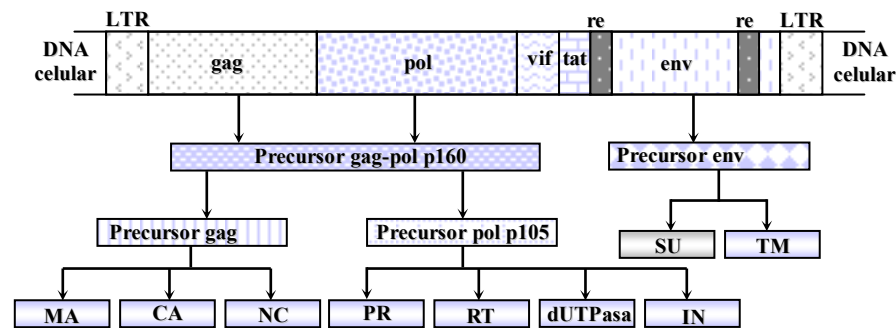
1.- *Rev* produce una proteína que regula la expresión de proteínas virales vía un mecanismo post transcripcional. Se trata de una proteína de 18 kDa. Se involucra en los empalmes de los transcritos de ARN virales estabilizándolos para su exportación del núcleo al citoplasma. Emplea su papel regulatorio vía el elemento de respuesta de *rev* (RRE), el cual es un rizo en la cadena del ácido nucleico. Éste es capaz de unir el genoma a través de un sitio de unión del ARN (Saltarelli *et al.*, 1994).

2.- *Vif* codifica una proteína de 28 kda (Factor de infectividad viral) que es requerida en algunos pasos de la síntesis y formación de la nucleocápside viral, que determina la infectividad y la liberación. Existen reportes de que es esencial para permitir la replicación viral *in vitro* en macrófagos primarios, así como para una eficiente replicación y patogenicidad *in vivo* (Harmache *et al.*, 1995, Seroude *et al.*, 2002).

3.- *Tat* codifica una proteína de aproximadamente 11 kDa, la cual se considera un potente

transactivador que incrementa la eficiencia de transcripción de la ARN polimerasa celular durante la maduración monocito/macrofago, permitiendo la expresión génica viral (Saltarelli *et al.*, 1994). Ver figura 3.

Figura 3.- Estructura del provirus y sus productos de transcripción y traducción.



MA.- Proteína de matriz.
 CA.- Proteína de cápside.
 NC.- Proteína de nucleocápside.
 PR.- Proteasa.

RT.- Transcriptasa reversa.
 IN.- Integrasa.
 SU.- Glicoproteína de superficie.
 TM.- Proteína transmembranal.

1.2 SUSCEPTIBILIDAD DE ESPECIE.

Los hospederos principales del VAEC son los caprinos de cualquier edad, sin predisposición de raza. Se ha demostrado experimentalmente que los ovinos son susceptibles a la infección por el virus.

El virus puede infectar *in vitro* células de muflon, venado rojo, corzo y bovino. Estas observaciones sugieren que es posible que el lentivirus ocasione infecciones cruzadas y se adapte a nuevos hospedadores en diferentes condiciones (Chebloune, 1999).

Actualmente AEC y Maedi Visna (VMV) han sido referidos como lentivirus de los pequeños rumiantes (LVPR) a partir de un consenso en la Unión Europea, dentro del proyecto COST 834, realizado en septiembre del 2002 en Lyon, Francia (Blacklaws *et al.*, 2004).

Trabajos recientes basados en la secuencia de los genes *gag* y *pol* de aislados alrededor del mundo, han demostrado que los lentivirus de los pequeños rumiantes difieren en un 25 a 37% entre los genes ya mencionados, y se pueden integrar en 4 grupos (A, B, C, D) por su secuencia (Pisoni *et al.*, 2005). Los grupos de secuencias A y B a su vez son subdivididos

en diferentes subtipos que varían entre ellos en un 15 a 27%. El grupo A contiene al menos 7 subtipos, A1 a A7, y el grupo B contiene 2, B1 y B2 (Shah *et al.*, 2004). A la fecha, los subtipos A1 y A2 han sido aislados solo de ovinos; y los subtipos A5, A7, B1, además de los grupos C y D han sido aislados solo de caprinos. En contraste, los subtipos A3, A4, A6 y B2 han sido aislados de ambas especies. Los subtipos A1 y B1 se consideran las cepas modelo para el virus de MV y CAEV respectivamente. El hecho de que algunos subtipos hayan sido aislados de ambas especies, indica que en algún momento ocurrió la transmisión interespecies, al menos una vez en cada uno de los subtipos, aunque la frecuencia y dirección de tal infección permanece desconocida (Zanoni *et al.*, 1998; Ravazzolo *et al.*, 2001).

En la tabla siguiente se resume la propuesta para la nueva agrupación de los LvPR, modificada de Shah *et al.*, 2004.

Tabla 1.- Propuesta de clasificación de los Lentivirus de los pequeños rumiantes.

Nueva designación de grupos.	A							B		C	D
Nueva designación de subgrupos.	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	B1	B2		
Características del aislamiento.	MVV-like.	Ovino	Ovino Caprino	Ovino Caprino	Caprino	Ovino Caprino	Caprino	CAEV- Cork like	Ovino Caprino	Caprino	Caprino

1.3 TRANSMISIÓN.

La carga viral en sangre y secreciones tiende a ser relativamente baja. Se señala por ejemplo que alrededor de 1×10^6 leucocitos sanguíneos se encuentran infectados (Ravazzolo *et al.*, 2006). Sin embargo, a pesar de la aparentemente baja cantidad de virus, la transmisión ocurre no solo de la madre a la cría, sino también entre adultos. No está completamente esclarecido cuales rutas de transmisión son efectivas, aunque se sabe que la más importante es la vía del calostro (Adams *et al.*, 1983). Por lo tanto, es importante describir completamente cuales son las vías de transmisión utilizadas por el virus para mejorar los programas de prevención y control de la enfermedad.

1.3.1 Transmisión Vertical.

1.3.1a Calostro y Leche.

La principal vía de transmisión del VAEC es el calostro y la leche. Se ha demostrado en varios estudios que la glándula mamaria es un órgano blanco para la replicación del virus, los niveles de virus en este órgano varían dependiendo de la etapa de lactación, se ha correlacionado la expresión del virus con la inducción de la lactancia (Lerondelle *et al.*, 1989). Claramente se ha demostrado la presencia del VAEC en leche y calostro. Adams *et al.* (1983), demostraron que se puede aislar el virus de las células presentes en la leche y de leche libre de células, además de que sobrevive al congelamiento. Se sabe que las células que trasladan el virus a la leche son principalmente macrófagos, sin embargo existen estudios donde se ha demostrado la permisividad de las células del epitelio de la glándula mamaria a la replicación *in vitro* y se ha logrado aislar el virus a partir de células epiteliales mamarias de animales seropositivos (Blacklaws *et al.*, 2004).

1.3.1b Transmisión transplacentaria.

La vía de transmisión transplacentaria ya ha sido estudiada y se considera un tema controversial. Algunos autores han aportado evidencias a favor de esta vía de transmisión, mientras que otros han obtenido datos contrarios. El ambiente intrauterino es adecuado para la transmisión VAEC desde la madre al feto durante la gestación. Un estudio demostró que las células epiteliales del oviducto pueden ser infectadas *in vitro* con el VAEC, aunque aun no existen reportes *in vivo* (Lamara *et al.*, 2001,2002). También se ha detectado la presencia del virus en lavados de oviducto de cabras seropositivas al VAEC, así como en muestras de tejido de útero y oviducto (Fieni *et al.*,2003), sugiriendo que el feto puede estar expuesto al virus *in vivo*. También existen reportes de infección directa de embriones y fetos de manera experimental (Blacklaws *et al.*, 2004). Más evidencias sobre la transmisión transplacentaria han sido sugeridas por diversos grupos que reportan infecciones en cabritos aislados de todo contacto con su madre. En animales alimentados con leche pasteurizada o sustitutos lácteos en programas de control, se ha presentado hasta 10% de seroconversión inexplicable (Rowe *et al.*, 1997).

1.3.2 Transmisión Horizontal.

1.3.2a Contacto Directo.

El contacto directo entre animales también puede ser una vía de transmisión, se reporta que en los animales que se mantienen encerrados en hacinamiento por periodos largos aumenta el porcentaje de seroconversión (Robinson *et al.*, 1986). La separación y aislamiento de animales ha tenido buenos resultados para disminuir los porcentajes de infección. Aparentemente los cabritos separados de su madre y mantenidos en grupos de animales seronegativos, tienen una menor posibilidad de seroconvertir (Adams *et al.*, 1983). Los factores que aumentan el riesgo de infección por esta vía son: edad avanzada, hacinamiento, y exposición prolongada (Rowe *et al.*, 1997).

1.3.2b Transmisión Sexual.

Existen relativamente pocos estudios sobre esta vía de transmisión. Se ha observado un mayor grado de seroconversión en hembras apareadas con machos infectados; también se ha demostrado la presencia del VAEC en células presentes en el moco estral de cabras infectadas, en epidídimo y vesícula seminal, así como en semen de machos caprinos infectados (Rowe *et al.*, 1999; Travassos *et al.*, 1999; Thibier *et al.*, 2000; Blacklaws *et al.*, 2004; Ali Al Ahmad *et al.*, 2008, Peterson *et al.*, 2008). Esto también sucede con otros retrovirus, como el virus de la inmunodeficiencia humana, el de la inmunodeficiencia del simio, el de la inmunodeficiencia bovina y el de la inmunodeficiencia felina, en los cuales ya se ha comprobado su transmisión por esta vía (Mermin *et al.*, 1991; Miller *et al.*, 1998; Gradil *et al.*, 1999; Jordan *et al.*, 1998).

El semen utilizado para inseminación artificial puede contener virus, sin embargo a la fecha no existen reportes de que este pueda transmitir la enfermedad, aunque claramente puede representar un riesgo (Blacklaws *et al.*, 2004).

1.3.2c Iatrogénica.

Existen estudios que demuestran que se puede ocasionar seroconversión en hembras durante el ordeño, al inocular células infectadas en el canal del pezón (Lerondelle *et al.*, 1995). Sin embargo, la transmisión a través de máquinas ordeñadoras mecánicas contaminadas no ha sido demostrada aún. Tampoco la transmisión mecánica a partir de

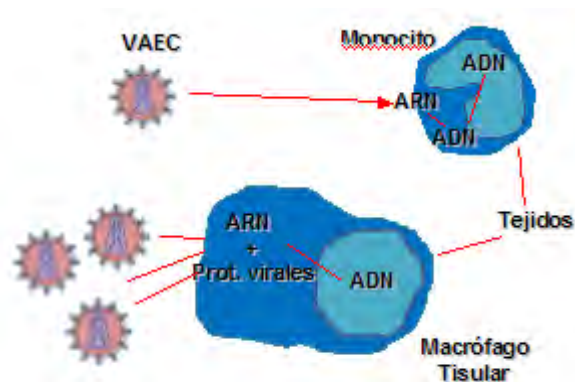
agujas contaminadas u otro instrumental quirúrgico ha sido demostrada, aunque teóricamente debe ser tomada en cuenta (Blacklaws *et al.*, 2004).

1.4 PATOGÉNIA.

1.4.1 Células blanco.

Las principales células blanco para el VAEC son las pertenecientes a la línea monocito-macrófago, además de las células dendríticas. Los monocitos que contienen el provirus en su genoma presentan poca o ninguna expresión viral. Se ha postulado que estas células funcionan como “Caballo de Troya”, capaces de transportar al virus a diferentes órganos (Ver figura 4); el virus entra en el monocito transcribe su ARN en ADN y lo integra al genoma de la célula, de esta forma puede evadir al sistema inmune (Zink *et al.* 1990, Peluso *et al.* 1988). La maduración de monocitos a macrófagos, que es precedida por la extravasación de estas células en varios tejidos, activa la transcripción de los factores necesarios para la replicación, iniciando así la producción de los componentes virales (Narayan *et al.* 1983).

Figura 4. Efecto de Caballo de Troya, que permite al VAEC invadir tejidos y evadir al sistema inmune.



Muchos otros tipos celulares se consideran permisivos a la infección, tanto *in vitro* como *in vivo*, y pueden participar en diferente grado como reservorios del virus, así como en la

transmisión de la enfermedad (Bertoni, 2007).

Se ha detectado el provirus del VAEC en tejidos del tracto reproductor de la hembra: útero, oviducto y ovario. *In vitro* se ha demostrado que células de la granulosa y células del epitelio del oviducto, son permisivas a la replicación viral (Ali Al Ahmad *et al.*, 2005).

También se ha detectado la presencia del virus en células pertenecientes a la médula ósea de animales asintomáticos; principalmente en macrófagos, fibrocitos y células endoteliales (Grossi *et al.*, 2005). Sin embargo estudios *in vitro* han determinado que la infección de los fibrocitos de médula ósea no es productiva a menos que se cocultiven con células permisivas, lo cual demuestra que este tejido puede funcionar como reservorio viral (Grossi *et al.*, 2005).

1.4.2 Replicación.

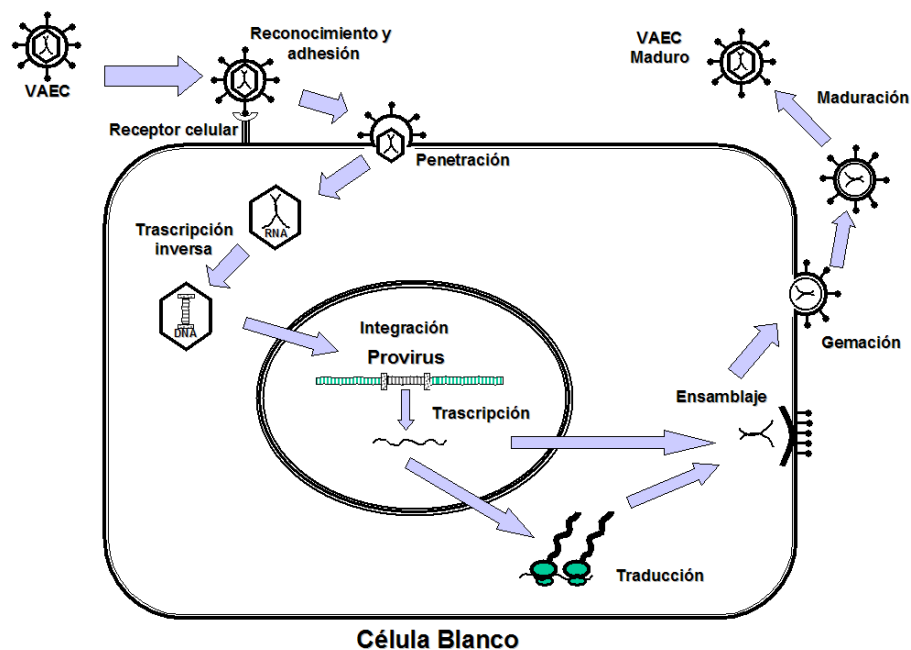
Al entrar en contacto con una célula permisiva, las partículas virales se fusionan con la membrana celular a través de la interacción de los ligandos presentes en las glicoproteínas de superficie con los receptores celulares, que, aunque desconocidos en el caso de este virus, parecen ser de tipo proteoglicano (Bruett *et al.*, 2000). A continuación, la nucleocápside es liberada en el citoplasma, donde comienza el proceso de transcripción reversa (Nisole *et al.*, 2004).

En este proceso se genera una doble cadena de ADN a partir del ARN, permaneciendo el ADN dentro de la cápside. Al final de la región U5 se encuentra un sitio de unión con una secuencia complementaria a la secuencia 3 del tARN, estos sitios marcan el comienzo de la síntesis de la cadena negativa de ADN viral, cuando esta cadena es completada, la cadena extra de ADN viral se sintetiza. El evento transcripcional es modulado por la unión con ciertas proteínas reguladoras (*Tat* y *Rev*) no para el provirus ADN, pero sí para transcriptos ARN. En el proceso de transcripción se adicionan a cada extremo del genoma viral las LTRs. La cápside es removida y el ADN es transportado al núcleo de la célula. El ADN es circularizado mediante uniones covalentes de las LTRs, después es integrado en el ADN cromosomal de la célula hospedera, adquiriendo en ese momento la denominación de provirus, el cual puede permanecer inactivo por largos periodos de tiempo. Este provirus después es utilizado para la transcripción por la ARN polimerasa celular iniciando en el extremo 5' LTR y finalizando en el 3' LTR generando nuevos viriones ARN y varios

ARNs mensajeros (Murphy *et al.*, 1999, Pétursson *et al.*, 1992).

La síntesis de proteínas se lleva a cabo después de la transcripción de 2 ARNs mensajeros principales: Uno de 35s, el cual posiblemente corresponda al ARN del virión completo y codifica el gen gag; este mismo es cortado en diferentes marcos de lectura para producir la proteína pol. Un ARN mensajero de 25s, empalmado del ARN de 35s, es traducido para producir el precursor de la proteína env, involucrando también diferentes marcos de lectura. Las principales poliproteínas son separadas post transcripcionalmente por la proteasa viral, dando origen a las proteínas virales maduras. Ver figura 5.

Figura 5.-Ciclo de replicación del VAEC.



1.5 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS.

Ya se ha mencionado que la artritis encefalitis caprina se puede presentar de 2 formas principales, una en cabritos con un cuadro nervioso y otra en animales adultos donde la afección es articular, pulmonar y mamaria (Bertoni, 2007).

1.5.1 Artritis.

La artritis, que es la principal manifestación de la enfermedad, se presenta comunmente en animales adultos. Clínicamente se caracteriza por un inicio insidioso, que conlleva a una inflamación permanente de articulaciones, usualmente simétrica; generalmente las articulaciones de los carpos son las primeras en mostrar la signología. Los animales muestran dolor únicamente en etapas muy avanzadas de la enfermedad. Infecciones experimentales han demostrado una clara asociación entre la carga viral y la severidad de las lesiones articulares. En estudios radiológicos se observan cambios patológicos tales como mineralización de tejidos blandos y erosión de las superficies articulares. Las articulaciones afectadas presentan volumen aumentado de líquido sinovial, con abundante presencia de células inflamatorias mononucleares. En el examen histológico se observa hiperplasia de células sinoviales, hipertrofia de las vellosidades, infiltración masiva de células mononucleares en la íntima y subíntima, así como angiogénesis. El infiltrado mononuclear tiende a organizarse formando focos linfoides, con focos germinativos de linfocitos B y capas de linfocitos T activados. Se encuentra gran cantidad de linfocitos B y células plasmáticas, expresando inmunoglobulinas, alrededor de los folículos y dispersas en toda la vellosidad inflamada (McGuire 1987, Wilkerson *et al.*, 1995).

1.5.2 Encefalitis.

Se presenta en crías de entre 2 y 6 meses de edad. Esta manifestación clínica está menos extendida que la forma artrítica de los adultos. Al principio, los animales presentan incoordinación al caminar, seguida de paresia y ataxia, para desembocar en tetraplegia en 1 a 3 semanas posteriores al inicio de la signología. Los animales se encuentran afebriles, alertas y con apetito normal. Se conservan reflejos normales y percepción del dolor inalterada. También se ha reportado hipertonia e hiperreflexia. Histológicamente se observan lesiones inflamatorias en cerebro y médula espinal, afectando también meninges y plexo coroideo. Se encuentra infiltrado linfoide perivascular focal, así como también macrófagos y células plasmáticas. Hay infiltración linfoide en materia blanca y proliferación de células de la glía. La desmielinización y malacia son prominentes, se encuentran calcificaciones focales, y en casos extremos cavitaciones en la materia gris de la médula espinal (Perk, 1999, Sanna *et al.*, 1999, Bertoni 2007).

1.5.3 Mastitis.

Se observa mastitis intersticial, la cual se manifiesta como induración de la glándula mamaria a nivel de la cisterna de la leche, provocando a su vez atrofia, pero sin edema, y con inflamación que afecta la producción de calostro y leche. Se observa en los 3 primeros días posteriores al parto. También puede haber una presentación subclínica con hipertrofia de los linfonodos retromamarios. Histológicamente se observa gran cantidad de infiltrado mononuclear diseminado por todo el tejido glandular, llegando a formar tejido linfoide ectópico (Robinson *et al.*, 1986, Peretz *et al.*, 1993).

1.5.4 Neumonía.

La presentación neumónica puede presentarse como neumonía intersticial crónica, que se establece en los lóbulos caudales y craneoventrales, situación que se acompaña por disnea y emaciación, es afebril y persiste el estado de alerta. Como en otros órganos, se observa gran cantidad de infiltrado y proliferación de linfocitos, células plasmáticas y macrófagos. Los macrófagos alveolares pueden considerarse un sitio de replicación importante *in vivo* (Dawson, 1987).

1.6 RESPUESTA INMUNE.

La respuesta inmune a este virus se da principalmente de dos formas. La primera, con una baja carga viral que consiste en un bajo título de anticuerpos hacia antígenos de superficie (SU- gp135) y transmembranales (TM-gp 41), con una producción de IgG2 contra antígenos TM, y una fuerte respuesta de linfocitos T subclase CD4, caracterizada por la producción de interferón gama. La segunda respuesta, característica de animales artríticos, está asociada con elevada carga viral y un aumento de anticuerpos IgG1 principalmente contra gp135 en suero y líquido sinovial, y un aumento de linfocitos TH2 (productores de IL-4) (Kemp *et al.*, 2000; Beyer *et al.*, 2001). Es importante resaltar que el virus no produce inmunosupresión en los macrófagos, pero sí una desregulación en la producción de citocinas, con elevada producción del factor de necrosis tumoral alfa (TNF α), que clínicamente se manifiesta con caquexia en los animales infectados. El encontrar anticuerpos contra el virus indica que no se afecta la respuesta humoral, y es indicio de

infección (Robinson *et al.*, 1986 ; Lechner *et al.*,1997).

Los macrófagos caprinos infectados por VAEC presentan una desregulación de proteínas, incrementándose la expresión de interleucina 8 (IL-8) que favorece las respuesta Th2, y de una proteína que atrae a los monocitos (MCP-1). Además, cuando se enfrentan dichos macrófagos a estímulos bacterianos, disminuye la expresión del factor de necrosis tumoral alfa (TNF α), IL-1 β , IL-6, e IL-12. Algunos de estos efectos de la infección del macrófago (incremento de IL-8, MCP-1 y disminución de IL-12) podrían tener un importante papel en la desviación de la respuesta inmune hacia Th2(Lechner *et al.*, 1997).

1.7 DIAGNÓSTICO.

1.7.1 Diagnóstico directo.

1.7.1a Aislamiento. El VAEC se puede aislar *in vitro* en células fibroblásticas derivadas del plexo coroideo o de membrana sinovial (Rolland *et al.*, 2004). Sin embargo, la presencia de virus en una muestra no implica necesariamente que sea capaz de infectar el cultivo celular con el que se pone en contacto. Para conseguir el aislamiento del virus se emplean fundamentalmente 2 métodos: el explante primario y el cocultivo. Con ambos métodos el efecto citopático característico provocado por la replicación viral es la formación de sincitios, normalmente en 2 o 3 semanas, aunque es necesario esperar por lo menos 50 días para dar por negativo un cultivo (Crawford *et al.*, 1980; Hotzel *et al.*, 2001). El aislamiento viral es un método poco práctico, caro, complejo, lento y no muy sensible, por lo que en ningún caso se utiliza como prueba diagnóstica rutinaria.

1.7.1b Diagnóstico molecular. Muchos estudios han descrito el uso de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la detección del virus en muestras de sangre, leche y tejidos. Las secuencias genómicas que sirven como blanco en las técnicas descritas pertenecen a la región LTR, al gen *pol* y al gen *gag*. Algunas de estas regiones se consideran más conservadas, por ejemplo: *pol* y LTR son más conservadas que *gag*, a su vez la región *env* es muy variable comparada con las otras tres (de Andres *et al.*, 2005).

La PCR es rápida, sensible y específica para la detección del ácido nucleico viral en muestras obtenidas de células mononucleares sanguíneas, de fluido sinovial y células de

leche, reportando en algunos trabajos una sensibilidad y especificidad del 91% y 97% respectivamente. Se calcula que la técnica de PCR requiere el ADN de solo 15000 células, 188 partículas virales o 100 ng de ADN de células de membrana sinovial infectadas (Reddy *et al.*, 1993; Clavijo *et al.*, 1996; Rimstad *et al.*, 1993).

1.7.2 Diagnóstico Indirecto.

La forma más conveniente de diagnosticar la AEC es mediante pruebas serológicas. Una gran variedad de técnicas existen actualmente para tal fin. Estas incluyen inmunodifusión en agar (IDAG), inmunoensayo ligado a enzimas (ELISA), radioinmunoprecipitación (RIPA), radioinmunoensayo (RIA) y Western Blot (WB) (de Andres *et al.*, 2005).

A pesar de las muchas ventajas que tienen este tipo de pruebas, no podemos pasar por alto algunos inconvenientes:

- Seroconversión retardada. Aunque la respuesta inmune humoral a la infección suele ser temprana, siempre existe un periodo de retraso, que en ocasiones se prolonga entre meses y años (Rimstad *et al.*, 1993).
- Pérdida de títulos detectables. Algunos animales presentan una respuesta humoral débil, que puede no ser detectada.
- Influencia de las condiciones de almacenamiento. Sueros frescos o bien conservados con resultados de ELISA sospechosos se convierten en positivos si las condiciones de almacenamiento no son adecuadas, ya que la desnaturalización de las proteínas aumenta el riesgo de reacciones inespecíficas que alteran el resultado (Perrin *et al.*, 1998).
- Ausencia de una “prueba de oro”, con la cual comparar las distintas pruebas serológicas que se desarrollan (Knowles 1997).

1.7.2 a Inmunodifusión en agar (IDAG).

Se considera una de las técnicas mas ampliamente utilizada para el diagnostico de esta enfermedad. La sensibilidad de esta prueba para la detección de anticuerpos anti-VAEC depende del antígeno utilizado. Ya se ha demostrado que las pruebas de IDAG que utilizan la glicoproteína de superficie gp135 presentan una mayor sensibilidad que las que utilizan

la proteína de cápside p28 (Knowles *et al.*, 1994).

Existen Kits comerciales que usan antígenos de VMV o VAEC, pero se considera que tienen una pobre sensibilidad, atribuible a la divergencia entre las proteínas gag (25%) y env (40%) de VAEC y VMV. Otro factor relacionado es que la IDAG requiere la participación de múltiples interacciones epítotope-anticuerpos para obtener un resultado positivo, mientras que otras pruebas como inmunoprecipitación requiere la unión de un solo epítotope por anticuerpo (Reddy *et al.*, 1993, Kwang *et al.*, 1995; Knowles *et al.*, 1994). La combinación de las proteínas p24, p28, gp45 y gp135 mejoran mucho los resultados serológicos (Kirkland *et al.*, 1987; Knowles *et al.*, 1994).

1.7.2b ELISA.

Las técnicas inmunoenzimáticas (Enzymed-Linked Immunosorbent Assay, ELISA) presentan la característica de tener una alta sensibilidad, especificidad, rapidez y economía. Se pueden realizar estudios poblacionales en corto plazo, además de ser sencillas y no requerir instalaciones costosas. Los distintos Kits de ELISA indirecta disponibles para diagnóstico de AEC presentan valores muy altos de sensibilidad y especificidad, sin que existan grandes diferencias entre aquellos que utilizan virus completo o los que utilizan proteínas recombinantes, sin bien estos últimos presentan parámetros diagnósticos ligeramente mejores y además son más baratos de producir por la facilidad de obtención de grandes cantidades de antígeno purificado. El ELISA competitivo obtiene los mejores resultados (Peterhans *et al.*, 2004; de Andres *et al.*, 2005).

1.7.2c Otras pruebas serológicas.

La RIPA, la RIA y el WB no son de uso común debido a que se trata de técnicas engorrosas que consumen mucho tiempo para su desarrollo. Sin embargo, pueden ser utilizadas como “Estándar de oro” para validar otras técnicas de diagnóstico para el VAEC (de Andres *et al.*, 2005). Experiencias obtenidas con el virus de inmunodeficiencia humana (VIH) han demostrado que el WB tiene una sensibilidad mayor que el ELISA, por lo cual se ha utilizado rutinariamente para la comprobación de los resultados sospechosos (Mylonakis *et al.*, 2000). Esta situación se ha repetido en forma experimental con el VAEC pero aún no es una práctica común (Zanoni *et al.*, 1989).

1.8 PREVENCIÓN Y CONTROL.

Actualmente no existe tratamiento para la enfermedad. Fármacos antiinflamatorios pueden ser utilizados como paliativo para algunos signos clínicos, especialmente la artritis. Por otro lado, el uso de inmunógenos experimentales contra este virus no han permitido controlarla, exacerbando los casos de artritis y no previenen adecuadamente contra los desafíos (Knowles *et al.*, 1990; Vitu *et al.*, 1993., Russo *et al.*,1993). Por lo tanto deben tomarse en cuenta puntos específicos de prevención y control para manejar los hatos con respecto al VAEC.

- Se requiere realizar pruebas serológicas rutinarias con intervalos de 6 a 12 meses, por un mínimo de 5 años, prefiriéndose intervalos de 3 meses cuando no se encuentra evidencia de infección durante este periodo, y se busca un hato que pueda ser considerado libre del virus.
- Las crías no deben ser alimentadas con calostro o leche no pasteurizada de cabra si se trata de un hato positivo. Tampoco deben ser alimentadas con mezcla de leche de diferentes cabras, ya que si una sola hembra del rebaño es positiva, los cabritos pueden resultar infectados.
- La leche proveniente de otros rebaños no debe ser utilizada bajo ninguna circunstancia.
- Todos los animales nuevos deben ser serológicamente probados antes de introducirlos al rebaño.
- La importación de animales, tanto machos como hembras, semen, o embriones para transferencia, debe ser cuidadosamente monitoreada y controlada.
- Aislamiento de los animales reactores positivos.
- Aislamiento de la progenie de los reactores positivos.
- Los reactores positivos deben ser separados de los negativos por una distancia mínima de 1.8 metros.
- Separar los utensilios que se utilizan para proporcionar agua y alimentación.
- Ordeñar primero a las hembras seronegativas y después a las seropositivas.
- La remoción al nacimiento de las crías de hembras seronegativas, evitando el lamido y el amamantamiento, posibilita la obtención de un cabrito no infectado en la mayoría de los casos pero aumenta la mortalidad de cabritos.

- Aislar a los cabritos de las cabras seropositivas y criar con calostro o leche de vaca. Si se va a alimentar con leche de cabra, esta debe ser pasteurizada aunque provenga de hembras seronegativas, procurando no usar la que provenga de hembras seropositivas.
- Monitorear serológicamente a los cabritos.

(Robinson *et al.*, 1986, Kirkland *et al.*, 1987, Pétursson *et al.*, 1992, Rimstad *et al.*, 1993)

2.0 Hipótesis.

El virus de la Artritis Encefalitis Caprina (VAEC) puede infectar y permanecer en células epiteliales de las glándulas accesorias del aparato reproductor del macho caprino; además es capaz de generar una respuesta inmune humoral en fetos de pequeños rumiantes.

3.0 Objetivos.

3.1 OBJETIVOS GENERALES.

Demostrar la capacidad del Virus de Artritis Encefalitis Caprina de infectar cultivos celulares derivados del epitelio de Vesículas Seminales, Ámpulas y Glándulas Bulbouretrales de fetos de pequeños rumiantes; e identificar al provirus en muestras de los tejidos de las mismas glándulas obtenidas de machos caprinos infectados.

Identificar si el Virus de Artritis Encefalitis Caprina puede estimular la respuesta inmune humoral en fetos de pequeños rumiantes.

3.2 OBJETIVOS PARTICULARES.

* Establecer y mantener cultivos celulares a partir de glándulas accesorias del aparato reproductor de fetos machos de pequeños rumiantes para demostrar la infección con una cepa de referencia ATCC del VAEC.

* Detectar la presencia de antígenos virales y provirus del VAEC en cultivos celulares infectados mediante inmunohistoquímica e hibridación *in situ*.

* Detectar la presencia del provirus de VAEC mediante hibridación *in situ* en muestras de tejidos de glándulas accesorias obtenidas de machos caprinos infectados.

* Evidenciar la presencia de anticuerpos contra Lentivirus de pequeños rumiantes (LvPR) en fetos de ovino y caprino y determinar en que etapa de la gestación se puede dar esta respuesta.

4.0 Material y Métodos.

El trabajo se dividió en 3 etapas:

4.1 Estudio *In Vitro*.

4.1.1 Cultivos celulares.

Se obtuvieron fetos caprinos y ovinos machos en los rastros municipales de Tlalnepantla y Naucalpan, en el Estado de México. Estos fueron conservados en hielo para su traslado a la Unidad de Investigación Multidisciplinaria en Salud Animal en la FES Cuautitlán.

Los fetos se desinfectaron y quirúrgicamente se extrajeron las glándulas accesorias (vesículas seminales, glándulas bulbouretrales y ámpulas), que se colocaron en solución de Hank's sin glucosa con 1% de antibiótico, aproximadamente 15 minutos.

Las glándulas se lavaron 2 veces en solución de Hank's nueva y se retiró la cápsula, posteriormente se dividieron en fragmentos de aproximadamente 2 o 3 mm. Éstos se colocaron en cámaras de cultivo Lab-Tek (Cat. 177445) de 8 pozos y en laminillas cargadas para hibridación Probe on Plus (Fisher Scientifics. Cat. 15-188-52) estériles. Se les agregaron 200 µl de medio de Glasgow con 10% de suero fetal bovino (SFB). Se incubaron a 37°C con una atmósfera de 2% de CO₂, se agregaron 100 µl de medio diariamente.

4.1.2 Preparación del inóculo.

En cultivos de células de membrana sinovial de cabra (MSC), se inoculó al virus cepa de referencia ATCC VAEC VR-905, cepa clonada 75-G63. Se revisaron diariamente hasta la observación de la formación de sincitios. Aproximadamente a los 21 días se observó el efecto citopático y se procedió a cosechar el sobrenadante. Este sobrenadante se tituló en MSC cultivadas en pacas de 96 pozos, en diluciones logarítmicas obteniéndose un título de 10³ unidades formadoras de sincitios (UFS).

4.1.3 Inoculación de los cultivos celulares.

Se retiró el medio de cultivo de las laminillas y se agregaron 100 µl de inóculo 10³ UFS, 24 horas después se agregaron 100 µl de medio de Glasgow con 2% SFB, y diariamente se agregó más medio si era necesario.

A los 7, 14 y 21 días postinfección (PI) se retiró el sobrenadante y se conservó en congelación para posteriores estudios, los cultivos se fijaron con metanol para inmunohistoquímica y con paraformaldehído para hibridación. Se mantuvieron a 4°C hasta su procesamiento.

4.1.4 Inmunohistoquímica.

Las laminillas se hidrataron con PBS durante 10 minutos, posteriormente se bloqueó la peroxidasa endógena con peróxido de hidrógeno al 0.5%, durante 15 minutos. Se realizaron 3 lavados de 5 minutos cada uno con PBS. Se bloqueó con suero porcino diluido 1:20 durante 1 hora a temperatura ambiente (TA). Se realizaron 3 lavados más. Se agregó el anticuerpo monoclonal anti-p28 de VAEC (VMRD, Inc. Cat. CAEP5A1) diluido 1:200 en PBS-ASB al 0.5%, y se incubó durante 2 horas TA en cámara húmeda. Se realizaron 3 lavados. Se agregó el anticuerpo anti-ratón biotilado (Bio SB. Cat. BSB0003) diluido 1:50 y se incubó durante 1 hora TA en cámara húmeda. Después del lavado se agregó estreptavidina preoxidada (Bio SB. Cat. BSB0003) y se incubó durante 1 hora TA en cámara húmeda. Se realizó el mismo proceso de lavado, y se agregó diaminobencidina al 1% con peróxido de hidrógeno 0.3% (Bio SB. Cat. BSB0003). Se esperó unos segundos a que se observara la reacción al microscopio óptico y se lavó con agua deionizada. Después se realizó la tinción de contraste con hematoxilina de Harris durante 30 segundos, se lavó con agua corriente, y se dio un baño con carbonato de litio durante 15 segundos. Se lavó con agua corriente y se montó con cubreobjetos y una solución 1:1 de agua destilada y glicerina para su observación al microscopio.

4.1.5 Hibridación *In Situ*.

Las laminillas se colocaron en el sistema Microprobe (Fisher Scientifics. Cat. 15-188-30, 20). Se hidrataron mediante alcohol en concentraciones decrecientes. Se realizaron 3 lavados con buffer de barbituratos pH 8.2, durante 1 minuto cada uno. Las laminillas se colocaron en PBT durante 3 minutos. Se les agregó proteinasa K y se incubó durante 15 minutos a 37°C. Se realizaron 3 lavados con PBT de 1 minuto cada uno. Se incubaron con anhídrido acético al 0.1% durante 10 minutos y se lavó 3 veces con agua deionizada. Se

agregó mezcla de hibridación sin sonda TA durante 5 minutos. Se agregó nueva mezcla de hibridación y se incubaron a 65°C durante 1 hora.

Se incubaron durante 5 minutos a 90°C. Se agregó la sonda de DNA de cadena sencilla marcada con digoxigenina, que detecta en el provirus la presencia de un fragmento del gen *pol* (Sanna *et al.*, 1999), diluida en mezcla de hibridación, y se incubaron durante 4 horas a 60°C. Posteriormente se incubaron toda la noche a 4°C. Se lavaron 2 veces con mezcla de hibridación sin sonda durante 10 minutos a 65°C, después se repitieron los dos lavados durante 45 minutos cada uno. Se lavaron con una solución 1:1 de mezcla de hibridación y TBST por 10 minutos a 65°C. Se lavaron 2 veces con TBST por 15 minutos. Se lavaron 3 veces con agua deionizada durante 2 minutos. Se bloqueó la peroxidasa endógena con peróxido de hidrógeno al 0.3% por 15 minutos. Se lavaron 3 veces con PBS durante 2 minutos. Se bloqueó con suero fetal caprino (SFC) diluido 1:20 durante 10 minutos. Se lavaron con PBS 3 veces por 2 minutos. Se agregó CAS-Block (ZYMED Laboratories. Cat. 84-9246) y se incubaron durante 10 minutos TA. Se eliminó el reactivo anterior sin lavar y se agregaron anticuerpos anti-digoxigenina (ZYMED Laboratories. Cat. 84-9246) incubándose durante 30 minutos. Se realizaron los lavados ya descritos. Se incubaron durante 30 minutos a TA con anticuerpos anti-ratón peroxidados. Se realizaron lavados con PBS. Se agregó DAB-Cromógeno (ZYMED Laboratories. Cat. 84-9246) y se observó la reacción al microscopio. Se lavaron 2 veces con agua deionizada durante 3 minutos. Se realizó tinción de contraste con hematoxilina de Harris durante 30 segundos. Se lavaron con agua corriente. Las laminillas se bañaron con carbonato de litio durante 15 segundos y se lavaron con agua corriente. Se deshidrataron mediante alcohol en concentraciones crecientes y se montaron con cubreobjetos y resina sintética para su observación al microscopio.

4.2 Estudio en muestras animales.

Se emplearon bloques de parafina de glándulas anexas al tracto reproductor de machos caprinos, obtenidos en un trabajo previo (Martínez *et al.*, 2005); los cuales correspondían a los órganos de animales evaluados mediante las pruebas de inmunodifusión en agar-gel (IDAG), ELISA, Western blot (WB) y reacción en cadena de la polimerasa (PCR), para

determinar su estado con respecto a la infección con el VAEC. Se distribuyeron en 4 grupos:

Grupo I : 5 animales infectados naturalmente con el VAEC.

Grupo II : 3 animales previamente negativos, inoculados con la cepa de VAEC de referencia ATCC VR-905.

Grupo III : 3 animales previamente negativos, inoculados con una cepa de VAEC aislada en FES Cuautitlán.

Grupo IV: 2 animales negativos al VAEC.

Además se obtuvieron 3 animales más: un animal adulto de 2 años de edad con evidente signología de artritis y problemas respiratorios crónicos, un animal adulto de 1 año de edad sin ninguna signología, un cabrito de 2 días de edad hijo de madre seropositiva que además tenía signología nerviosa. Estos animales fueron evaluados por IDAG y ELISA. El animal sin signología resultó seronegativo a ambas pruebas y se incluyó en el grupo control negativo. Los otros dos se incluyeron en el grupo I. Se sacrificó a los animales y se obtuvieron muestras de diferentes tejidos incluyendo las glándulas anexas ya mencionadas. Se conservaron con paraformaldehído al 4% y se incluyeron en parafina.

Se realizaron cortes de 4 micras y se colocaron sobre laminillas cargadas para hibridación Probe on plus (FisherScientifics. Cat. 15-188-52).

4.2.1 Hibridación In Situ.

La técnica de hibridación en tejidos es similar a la utilizada en cultivos celulares con las siguientes modificaciones:

- Se desparafinaron los tejidos durante 30 minutos a 60°C, posteriormente se lavó 3 veces con xilol durante 1 minuto. Las laminillas se colocaron en el sistema Microprobe (Fisher Scientifics. Cat. 15-188-30, 20). Se hidrataron mediante alcoholes progresivos. Se agregó PBT y se incubó durante 3 minutos.
- No se utilizaron lavados con buffer de barbituratos pH 8.2.

4.2.2 Análisis Estadístico.

Con a finalidad de demostrar una mayor afinidad del VAEC por alguna de las 3 glándulas estudiadas se ordenaron los resultados positivos obtenidos en una tabla, tomando en cuenta

a que glándula y a que grupo de animales correspondían. Esta fue analizada mediante tablas de contingencia y prueba de chi cuadrada, utilizando el programa de análisis estadístico Prism Ver 4.0., buscando diferencias significativas entre grupos o entre glándulas.

4.3 Serología fetal.

En los rastros Municipales de Tlalnepantla y Naucalpan, al momento del sacrificio de hembras gestantes se obtuvieron 119 fetos (54 caprinos y 65 ovinos).

Se determinó el tiempo aproximado de gestación mediante la medición de la distancia de la nuca a la base de la cola (Lyngset, 1971), obteniendo un rango de 50 a 145 días de gestación.

Se obtuvo sangre o líquido torácico. Posteriormente se centrifugó a 3500 RPM por 10 minutos para separar el suero del paquete celular. El suero se conservó en congelación a -70°C hasta su uso.

4.3.1 ELISA.

Los sueros fueron evaluados mediante el KIT Maedi-Visna/CAEV Serodiagnosis, ELISA TEST SERUM, Institut Pourquier, Versión P00302/02. Una técnica de ELISA indirecta que detecta IgGs mediante 2 péptidos inmunogénicos: proteína transmembranal (TM, gen ENV) y una proteína P28 recombinante, componente de la cápside viral (gen GAG). El uso de estas proteínas tan conservadas permite la detección de un amplio espectro de variantes serológicas.

5.0 Resultados.

5.1 Estudio *in vitro*.

Se lograron establecer cultivos celulares mediante la técnica de explante. Se alcanzó una confluencia aproximadamente del 60%, las células presentaron 2 morfologías principales: fibroblásticas, posiblemente derivadas de partes de los intersticios glandulares; y epiteliales, derivadas del epitelio glandular. Se logró mantener dichas células hasta 30 o 33 días, pero no sobrevivieron al tratar de dar un pase. Ver figura 6.

Una vez inoculados los cultivos se comenzaron a observar lesiones sugerentes de sincitios aproximadamente al día 14 PI. Lo cual fue confirmado mediante tinción de Papanicolau. Ver figura 7.

Con la inmunohistoquímica empleando el monoclonal para p28, se observó un marcaje positivo en los cultivos celulares de las tres glándulas, a los 14 y 21 días PI, los cultivos con 7 días PI procesados no presentaron dicho marcaje. El marcaje se observó en las células de morfología epitelial. Ver figura 8.

Con la hibridación *in situ* se observó señal de hibridación a nivel nuclear en células de morfología epitelial, en los cultivos de 14 días PI de las 3 glándulas. Ver figura 9.

Fig 6. Cultivos celulares derivados de las glándulas accesorias. a) Ámpula 5 días, b) Glándula Bulbouretral 5 días, c) Vesícula Seminal 5 días.

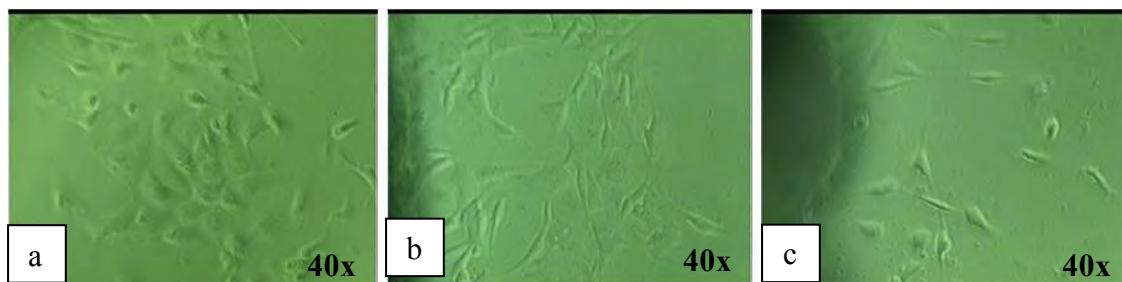


Fig. 7. Cultivos celulares infectados con el VAEC ATCC teñidas mediante la técnica de Papanicolau. Las flechas indican la presencia de sincitios. a) Vesícula Seminal 15 días PI, b) Glándula Bulbouretral 15 días PI. c) Vesícula Seminal control negativo. d) Glándula Bulbouretral control negativo.

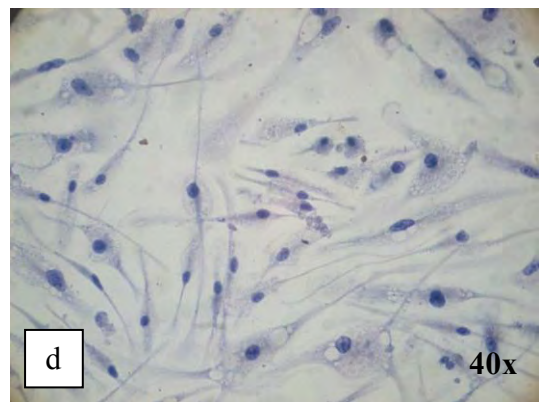
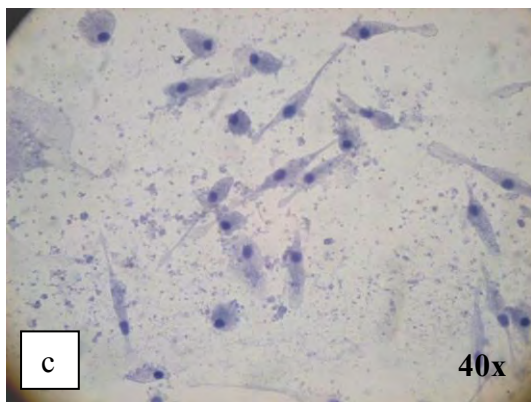
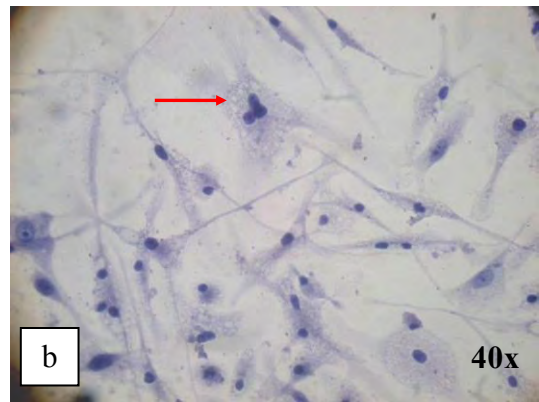
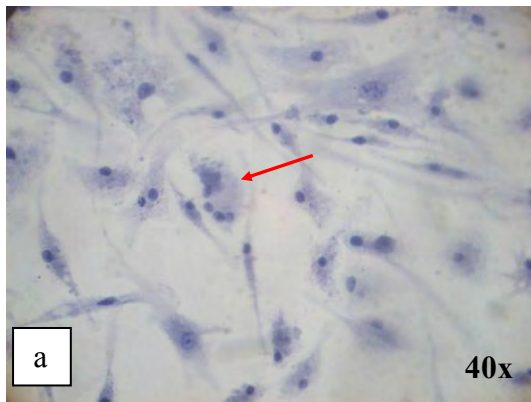


Fig. 8. Cultivos celulares 14 días post infección teñidos mediante una técnica inmunohistoquímica, las flechas indican la presencia de marcaje positivo a la proteína P28 del VAEC. a) Células de Ámpula infectadas, b) Células de Glándula Bulbouretral infectadas, c) Células de Vesícula Seminal infectadas, d) Ámpula control negativo, e) Glándula Bulbouretral control negativo, f) Vesícula Seminal control negativo.

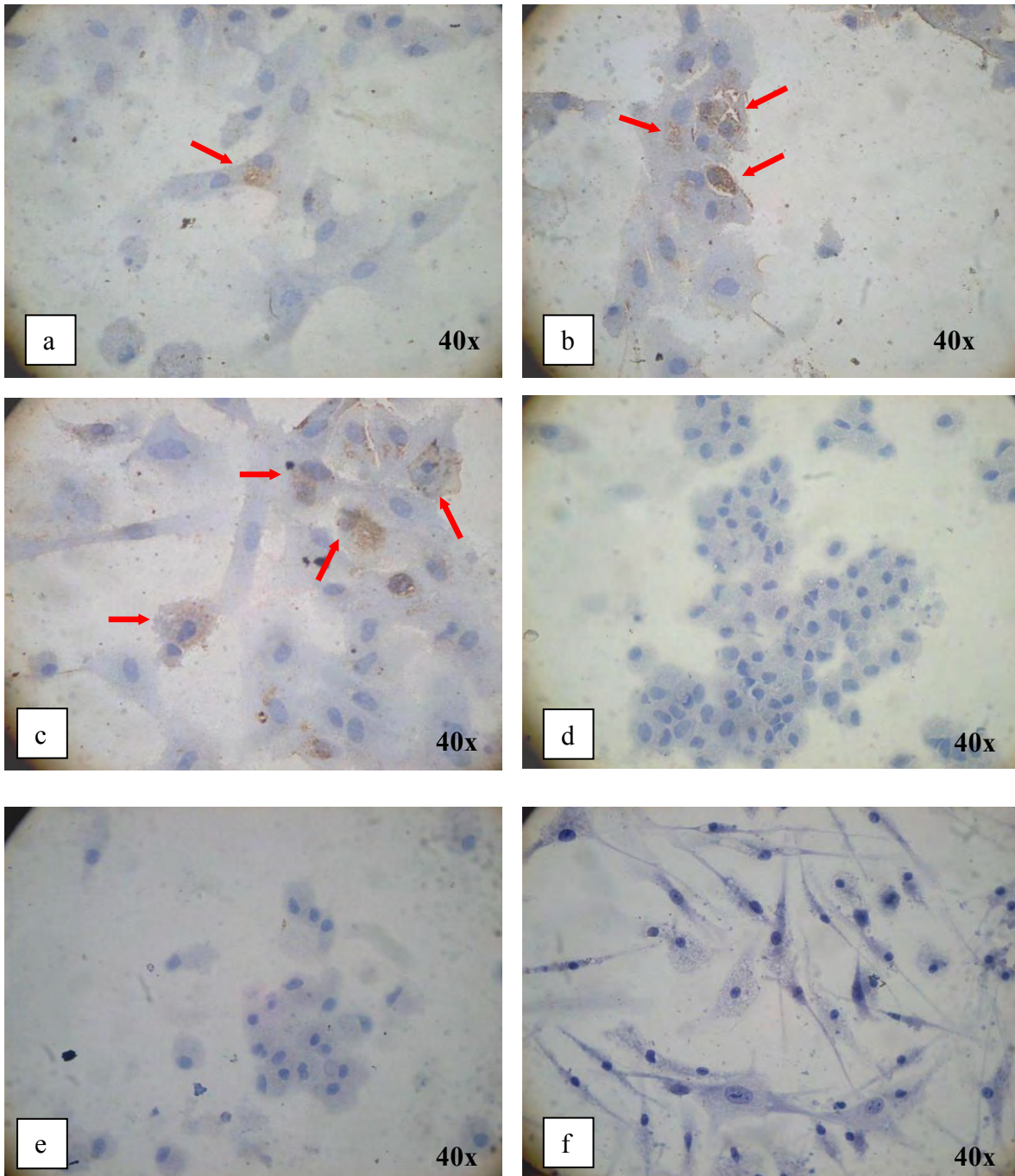
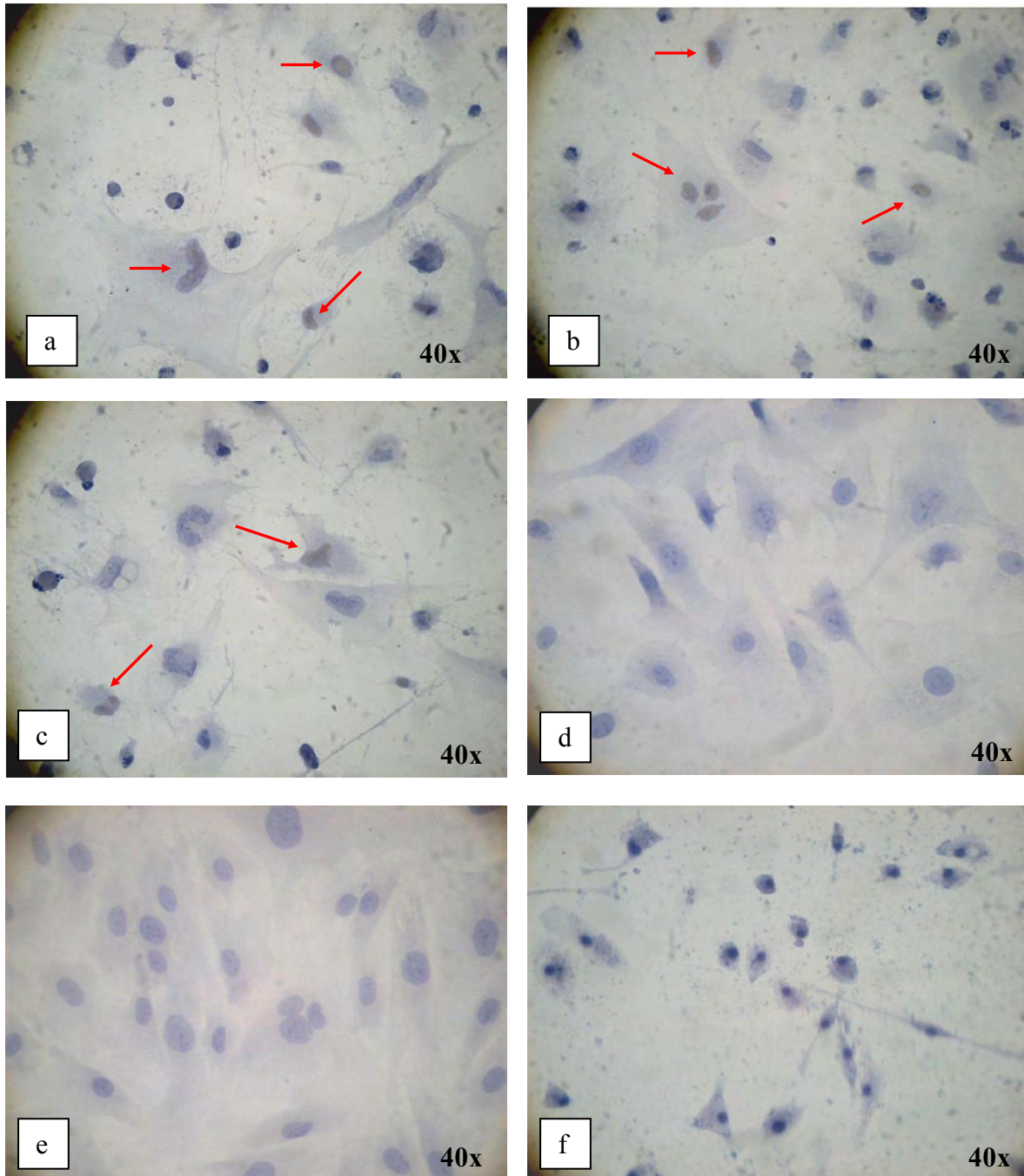


Fig. 9. Cultivos celulares 14 días post infección procesado mediante la técnica de hibridación *in situ*, las flechas indican la señal de hibridación del provirus del VAEC en los núcleos de células de morfología epitelial. a) Células de Vesícula Seminal infectadas, b) Células de Glándula Bulbouretral infectadas, c) Células de Ámpula infectadas, d) Vesícula seminal control negativo, e) Glándula Bulbouretral control negativo, f) Ámpula control negativo.



5.2 Estudio en muestras animales.

Se observaron señales de hibridación a nivel nuclear, en las células epiteliales de las tres glándulas de los grupos positivos. Mientras que el grupo de animales negativos no la presentó.

Todas las muestras se corrieron por triplicado. En la Tabla 2 se reporta el número de muestras positivas ordenadas por glándula y grupo al que corresponden:

Tabla 2.- Número de muestras de glándulas accesorias de machos caprinos, positivas a la hibridación *in situ*, en los 4 grupos .

Glándula /Grupo	Grupo I (Infección Natural)	Grupo II (Cepa ATCC)	Grupo III Inoculación FESC	Grupo IV Control Negativo
Vesícula seminal	6/7	1/3	3/3	0/3
G. Bulbouretral	5/7	2/3	1/3	0/3
Ámpula	4/7	2/3	2/3	0/3

Se analizaron estos resultados mediante tablas de contingencia y prueba de chi cuadrada. No se obtuvieron diferencias significativas entre los números de muestras con señal de hibridación entre las muestras de animales positivos (Grupos I, II, III), sin embargo si la hubo cuando se compararon con las muestras del grupo de animales negativos (Grupo IV). No se encontró diferencia significativa entre los resultados positivos de los 3 tipos de glándulas.

A continuación se presentan algunas microfotografías de las muestras procesadas por hibridación *in situ*. Ver figuras 10, 11 y 12.

Fig. 10.- Muestras de Vesícula Seminal de machos caprinos, procesadas mediante la técnica de hibridación *in situ*, las flechas indican la señal de hibridación del provirus de VAEC en los núcleos del epitelio glandular. a) Grupo I animales infectados naturalmente, b) Grupo II animales inoculados con una cepa de VAEC ATCC, c) Grupo III animales inoculados con un aislado en FESC, d) Grupo IV animales negativos al VAEC.

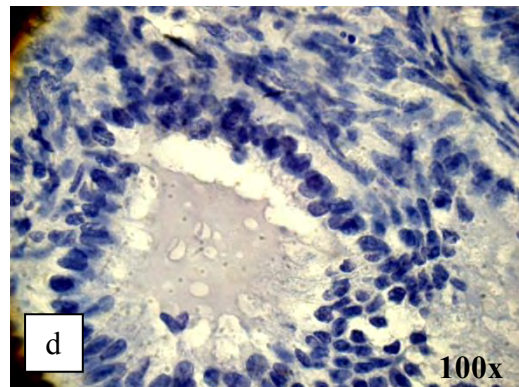
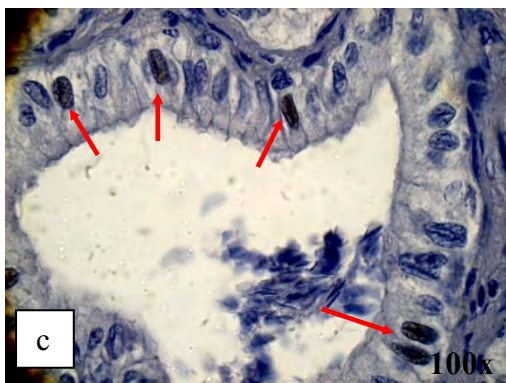
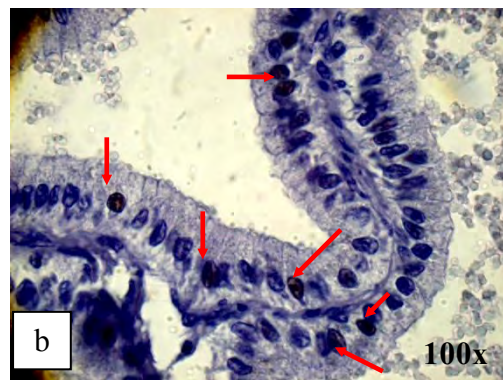
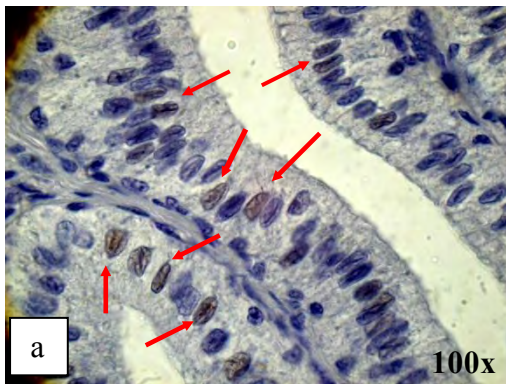


Fig. 11.- Muestras de Glándula Bulbouretral de machos caprinos, procesadas mediante la técnica de hibridación *in situ*, las flechas indican la señal de hibridación del provirus de VAEC en los núcleos del epitelio glandular. a) Grupo I animales infectados naturalmente, b) Grupo II animales inoculados con una cepa de VAEC ATCC, c) Grupo III animales inoculados con un aislado en FESC, d) Grupo IV animales negativos al VAEC.

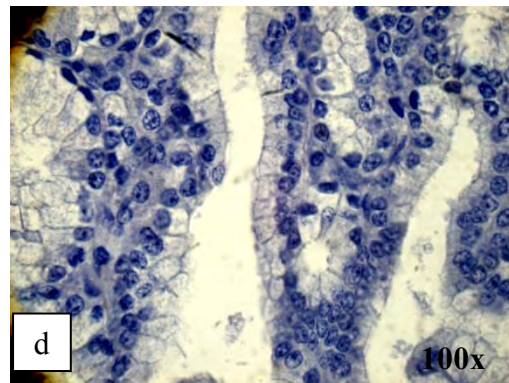
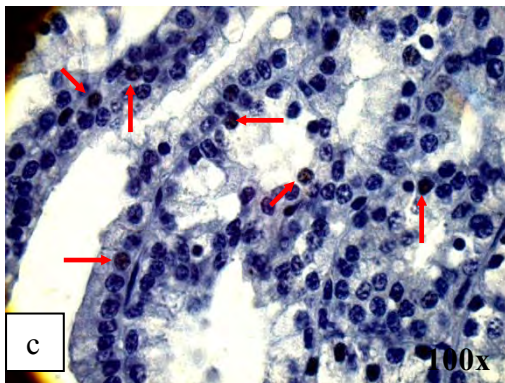
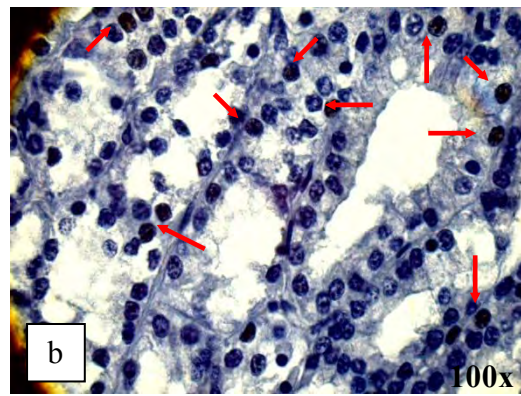
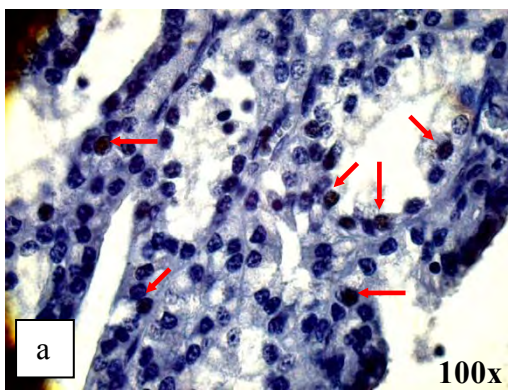
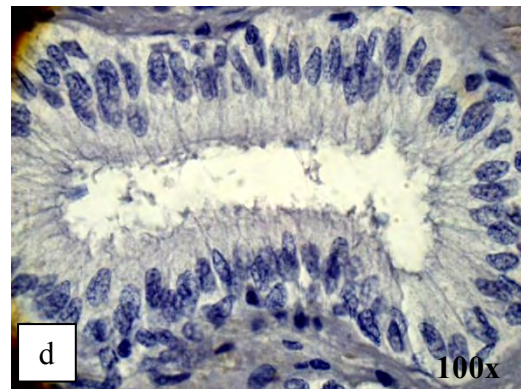
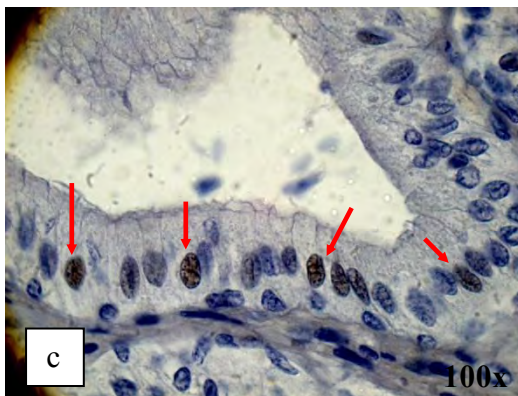
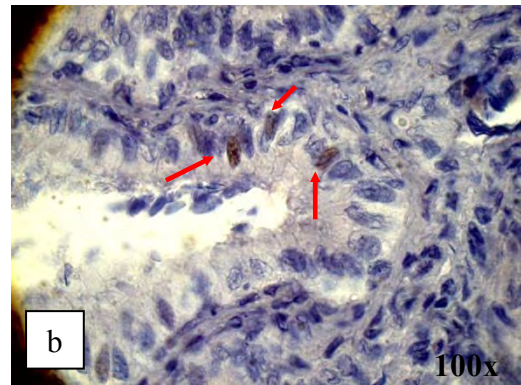
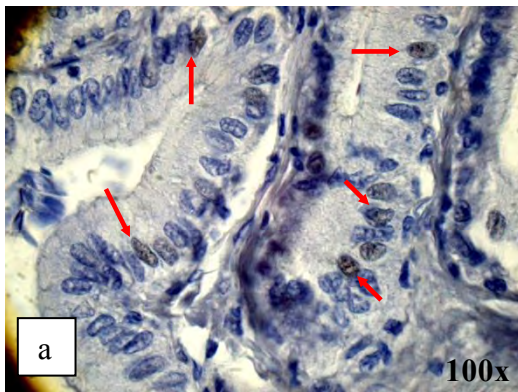


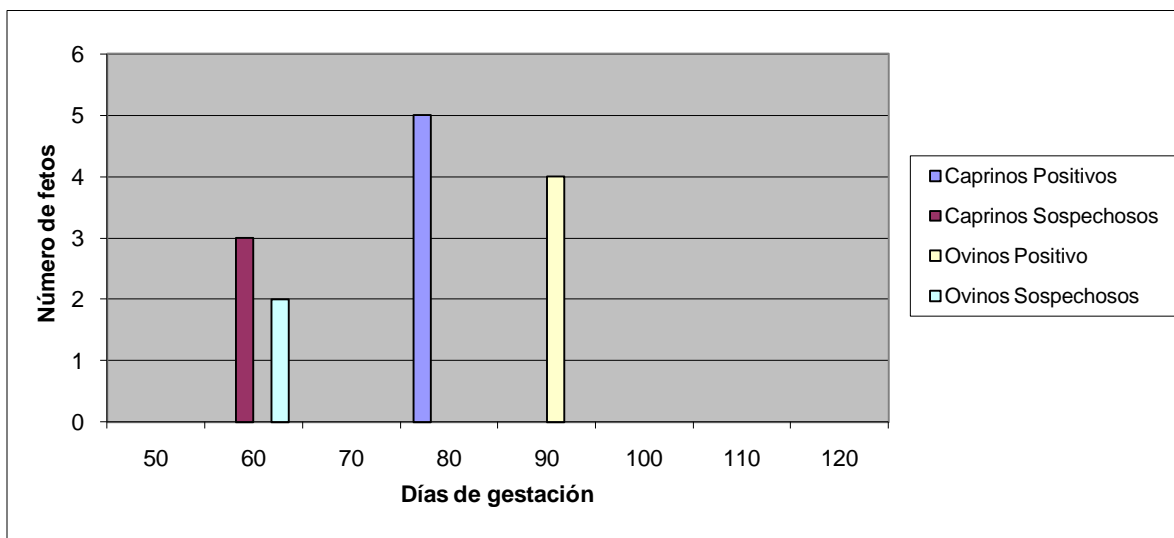
Fig. 1.- Muestras de Ámpula de machos caprinos, procesadas mediante la técnica de hibridación *in situ*, las flechas indican la señal de hibridación del provirus de VAEC en los núcleos del epitelio glandular. a) Grupo I animales infectados naturalmente, b) Grupo II animales inoculados con una cepa de VAEC ATCC, c) Grupo III animales inoculados con un aislado en FESC, d) Grupo IV animales negativos al VAEC.



5.3 Serología fetal.

Se detectaron 9 fetos seropositivos y 5 sospechosos. De los positivos 5 eran fetos caprinos de aproximadamente 80 días de gestación; 4 eran fetos ovinos de entre 90 y 100 días de gestación y los 5 fetos sospechosos 2 eran de origen ovino y 3 de origen caprino, de aproximadamente 60 días de gestación. Los resultados se resumen en la Grafica 1.

Grafica 1.- Número de sueros de fetos positivos y sospechosos a la presencia de anticuerpos contra Lentivirus de Pequeños Rumiantes, distribuidos por días de gestación.



6.0 Discusión.

Los ensayos *in vitro* sugieren que las células epiteliales de las glándulas accesorias son permisivas a la replicación viral, ya que se demostró el provirus a nivel nuclear por hibridación *in situ* y la proteína p28 sobre la membrana de las células por inmunohistoquímica, lo cual pudiera indicar un proceso activo de replicación. Por otro lado los resultados obtenidos en muestras de animales infectados indican la presencia del provirus en el núcleo de células epiteliales de las glándulas accesorias del tracto reproductor de machos caprinos infectados con el VAEC. No se encontró una diferencia significativa en el número de muestras positivas entre los tres tipos glandulares estudiados que pudiera indicar una mayor predisposición de una u otra a la infección.

Se han realizado algunos trabajos para mantener *in vitro* células o tejidos pertenecientes a glándulas accesorias del tracto reproductor de diferentes especies, con distintas finalidades; tales como cultivos de próstata de ratones postnatales, para estudiar efectos hormonales en la estructura glandular (Franks *et al.*, 1960; Franks, 1961). Se ha cultivado tejido testicular de ratas para estudios de espermatogénesis, lográndose rangos de supervivencia de hasta 6 meses (Steinberger *et al.*, 1964) de células de vesícula seminal y otras glándulas accesorias de ratón, obteniendo sobrevivencia de las células hasta por 28 días (Spring-Mills *et al.*, 1983). En estos trabajos se utilizó suplementación hormonal, a lo cual los autores atribuyen el tiempo de sobrevivencia de las células en cultivo ya que utilizaron tejidos provenientes de animales jóvenes; en contraposición, en este trabajo no se requirió suplementación hormonal, ya que los tejidos utilizados fueron de origen fetal, esto facilitó que la células se pudieran separar del tejido y crecer de forma satisfactoria sin la presencia de hormonas.

Existen antecedentes de la capacidad de infección y replicación del VAEC en células de diferentes epitelios. Mselli-Lakhal *et al.* (1999), demostraron *in vitro* que las células epiteliales derivadas de glándula mamaria son capaces de producir altos títulos virales sin presentar efecto citopático aparente. De la misma forma, Lamara *et al.* (2002), demostraron que las células epiteliales de los oviductos pueden tener la capacidad de funcionar como reservorios del virus. También se ha detectado el virus en células endoteliales del plexo coroideo de animales infectados (Sanna *et al.*, 1999). Inclusive se encontró antígeno viral en

células endoteliales y adipocitos de médula ósea (Grossi *et al.*, 2005). Martínez *et al.*, (2005) Ali Al Ahmad *et al.*, (2008) y Peterson *et al.*,(2008) han detectado al virus en tejidos del tracto reproductor de machos caprinos.

En el caso de Maedi-Visna (MV), que como ya se mencionó está muy relacionado con AEC (Zanoni *et al.*, 1998; Ravazzolo *et al.*, 2001; Shah *et al.*, 2004; Pisoni *et al.*, 2005), se han realizado pocos estudios, De la Concha *et al.*, (1996) no encontraron presencia del VMV en semen de animales infectados, sino hasta que se realizó una superinfección con *Brucella ovis* para inducir epididimitis. Resultados similares fueron obtenidos por Preziuso *et al.* en 2003. Estos trabajos concluyeron que cualquier proceso inflamatorio de los testículos puede inducir la excreción de virus al semen. Sin embargo, cuando se utilizaron carneros infectados como sementales, no se observó seroconversión en las ovejas sanas montadas, ni presentación de signos clínicos de la enfermedad (Krogsrud *et al.*, 1978). En un trabajo más reciente, se detectó DNA proviral de VMV en testículo, epidídimo, ámpula y vesícula seminal de carneros infectados experimentalmente, así como en el semen, sin que los animales presentaran algún tipo de proceso inflamatorio (Peterson *et al.*, 2008).

Otros lentivirus, como el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), el virus de la inmunodeficiencia del simio (VIS), el virus de la inmunodeficiencia felina (VIF) y el virus de la inmunodeficiencia bovina (VIB), han mostrado un comportamiento similar en cuanto a la infección de células epiteliales y la transmisión venérea; el VIH tiene la capacidad de infectar células epiteliales de la cavidad oral (Moore *et al.*, 2003), del epitelio intestinal (Delézay *et al.*, 1997), y se ha detectado la presencia de virus libre y asociado a células en el semen humano mediante PCR (Bujan *et al.*, 2002). El VIS también se ha demostrado en células epiteliales del tracto reproductor, tanto del macho como de la hembra (Miller, 1998). Le Tortorec *et al.*, (2008) mediante técnicas moleculares como PCR anidado, hibridación *in situ* e inmunohistoquímica reportaron la presencia del VIS en testículo, epidídimo, próstata, y vesícula seminal, en etapas tempranas de la infección. Esta última glándula presentó una mayor presencia viral en el epitelio secretor, esto puede explicar que a partir de la secreción glandular llegue el VIS en forma libre al semen, y no nada más asociado a células inflamatorias. Además, no se observaron cambios en la cantidad y calidad del eyaculado de los animales infectados. De la misma manera, Martínez *et al.* en 2005, reportaron la presencia de antígenos virales de AEC en estas mismas glándulas mediante

inmunohistoquímica. Además, reportaron que los cambios patológicos en el tracto reproductor atribuibles al VAEC encontrados eran mínimos en estos tejidos y no se alteró la cantidad ni la calidad del semen producido. Los resultados, que hemos obtenido en este trabajo, aunados a otros estudios que han detectado virus libre y virus integrado en las células mononucleares presentes en el semen, así como de otros órganos del tracto reproductor (Travassos *et al.*, 1999; Ali Al Ahmad *et al.*, 2008; Peterson *et al.*, 2008), soportan la posibilidad de la transmisión venérea del virus de la artritis encefalitis caprina. Sin embargo, en los trabajos de Ali Al Ahmad *et al.* (2008) y Peterson *et al.* (2008) se encontró la presencia del virus únicamente en células que pueden corresponder a macrófagos subepiteliales; en contraste, los resultados obtenidos en el presente trabajo demuestran la presencia del DNA proviral directamente en el epitelio glandular. Las tres glándulas producen la mayor parte de los componentes del líquido seminal (Wai-sum *et al.*, 2006) y sus células epiteliales son permisivas a la infección del virus, pudiendo aportar virus al semen y participar en la diseminación de la enfermedad, ya que la presencia del virus en el eyaculado puede diseminar la enfermedad por contaminación del ambiente, y eventualmente por transmisión venérea.

En el caso del Virus de la Inmunodeficiencia Felina se han hecho estudios similares obteniendo mediante PCR resultados positivos en diferentes tejidos del tracto reproductor, especialmente testículo y epidídimo, (Bishop *et al.*, 1996). La transmisión venérea en las inmunodeficiencias del humano, simio y del gato ha sido comprobada mediante la demostración de la producción de anticuerpos en hembras seronegativas después de la copula o inseminación artificial con semen positivo a la presencia de virus libre, y virus asociado a células (Mermin *et al.*, 1991; Miller *et al.*, 1998; Jordan *et al.*, 1998). En bovinos se ha detectado mediante la técnica de PCR la excreción de Virus de Inmunodeficiencia Bovina en forma asociada a células y libre en el semen, de forma intermitente (Nash *et al.*, 1995; Gradil *et al.*, 1999), sin embargo no se han realizado estudios para determinar cual es la fuente de partículas virales, ni se ha demostrado la capacidad de transmisión por vía venérea. La transmisión venérea también ha sido estudiada en la Leucosis Enzootica Bovina (LEB) que es causada por un retrovirus del género deltaretrovirus, sin embargo la información existente en la actualidad es contradictoria: Casal *et al.* (1990) y Choi *et al.* (2002), no obtuvieron resultados positivos mediante PCR ni observaron seroconversión en ensayos de inoculación

intraperitoneal de ovinos con semen de machos seropositivos; en contraste, Dus Santos (2006) y Dus Santos *et al.* (2007) han reportado, mediante PCR, la excreción intermitente de virus en semen de animales seropositivos, pero no evaluaron su infectividad. A pesar de esta situación se sigue considerando a la presencia de virus de LEB como restrictivo en el comercio de semen bovino para inseminación artificial.

Los machos caprinos infectados pueden jugar un papel importante en la prevalencia de la enfermedad en los hatos, ya que no se controla de forma adecuada a los sementales. Sin embargo, la posibilidad de la transmisión venérea debe ser demostrada en forma directa para AEC.

Otros agentes virales también han demostrado capacidad de infección del tracto reproductor de machos y su transmisión venérea. En el caso del rubulavirus porcino, causante de la Enfermedad de Ojo Azul, está bien demostrado que dentro de sus manifestaciones clínicas ocurre orquitis y epididimitis, con formación de granulomas espermáticos, y posterior atrofia del tejido (Ramírez-Mendoza *et al.*, 1997). Martínez *et al.* en el 2005 reportaron la presencia de algunos granulomas espermáticos en el epidídimo de machos caprinos infectados con el VAEC, pero no establecieron si eran causados por el virus o por algún otro proceso patológico. Además, la extensión del daño no llega al proceso inflamatorio como tal, sólo se ha reportado de forma poco común hidrocele y edema. También se ha reportado que el rubulavirus causa una disminución importante en la calidad y fertilidad del semen (Solís *et al.*, 2007), mientras que en el caso de AEC no se observa ningún tipo de alteración (Martínez *et al.*, 2005). Esto puede atribuirse a las diferencias en las características biológicas de ambos virus. El curso de la enfermedad por rubulavirus es mucho más rápido que el del lentivirus, por lo cual las alteraciones patológicas pueden ser mas extensas.

En Lengua Azul, ocasionada por un orbivirus ovino, el virus ha sido detectado en semen de animales virémicos, sin embargo su transmisión por esta vía se ha considerado de menor importancia, porque su ciclo requiere de la participación de las células epiteliales de su artrópodo vector (Thomas *et al.*, 1985; Afshar, 1994). Sin embargo, Gibbs *et al.* (1994) reportan que no es necesaria la presencia del vector para la transmisión de la enfermedad, por lo que no debe ser descartada esta posibilidad. El orbivirus puede ocasionar infertilidad pasajera, de la cual los animales se recuperan rápidamente y no altera la calidad del semen de los animales infectados (Thomas *et al.*, 1985).

El pestivirus bovino causante de la Diarrea Viral Bovina (DVB), también puede ser transmitido por el semen infectado; se ha reportado que animales infectados de forma persistente, excretan de forma intermitente altos títulos virales sin que exista daño aparente en los tejidos del tracto reproductor (Voges *et al.*, 1998). Además, Kirkland *et al.* en 1991 describieron en DVB que el testículo, epidídimo y glándulas accesorias son susceptibles a la infección y replicación del virus, siendo la vesícula seminal el sitio de replicación más productivo. Es importante recalcar sin embargo, que tanto el rubulavirus porcino, como el orbivirus ovino y el pestivirus bovino presentan diferencias muy importantes en cuanto a su biología y replicación, entre ellos, y cuando se comparan con el VAEC, lo cual puede explicar por qué en el caso de este virus, no se observan cambios patológicos importantes en los tejidos, ni se altera la fertilidad de los sementales.

Hasta ahora no existen datos sobre la respuesta humoral contra LvPR en fetos, por lo que la detección de anticuerpos contra VAEC en algunos de los fetos utilizados en este estudio es un primer reporte. Se ha observado que crías caprinas obtenidas mediante cesárea y alimentadas con calostro libre de virus pueden llegar a seroconvertir a los pocos meses del nacimiento (Rowe *et al.*, 1992). Se ha demostrado la susceptibilidad de las células epiteliales del útero a la infección con LvPR (Lamara *et al.*, 2002; Fien *et al.*, 2003); también se han infectado directamente fetos de forma experimental con resultados positivos y se ha logrado aislar el virus de fetos de aproximadamente 100 días de gestación (Cutlip *et al.*, 1982). Estos hallazgos pueden sugerir que la infección transplacentaria puede ocurrir, pero su importancia en la prevalencia de la enfermedad permanece incierta (Blacklaws *et al.*, 2004).

La posible transmisión venérea de macho a hembra, debe ser tomada en cuenta en los programas de control de AEC, ya que no solo existe la posibilidad de infectar a la hembra, sino también al producto de la gestación. Existen reportes en otros lentivirus como el VIH y el VIF que han demostrado la transmisión transplacentaria en diferentes etapas de la gestación (O'Neil *et al.*, 1996; DiMaria *et al.*, 1986). El VIF se ha utilizado como modelo animal de la transmisión transplacentaria del VIH, y se ha observado que ocurre generalmente durante el tercer tercio de la gestación; los principales tejidos blanco del VIF son cerebro fetal y tejidos ricos en monocitos (Rogers *et al.*, 1998). Es importante remarcar que el tipo de placentación de los felinos y humanos es diferente de la de los rumiantes, en las dos primeras ocurre el paso de macromoléculas de la madre al producto, facilitando el

paso de patógenos y anticuerpos (Anderson *et al.*, 1997), mientras que la de los rumiantes no permite este intercambio (Weaver *et al.*, 2000).

Las enfermedades virales al infectar al feto causan daños que desencadenan el aborto o la reabsorción del producto, cuando esto no sucede, el feto puede desarrollar inmunotolerancia, es decir, ser incapaz de montar una respuesta inmune adecuada contra el antígeno viral, como sucede en el caso de Diarrea Viral Bovina. El feto al infectarse en etapas tempranas de la gestación, comienza a reconocer los antígenos virales como propios, y los animales al nacer se infectan con cepas de campo, desarrollando cuadros muy fuertes y generalmente mortales, esto depende de la etapa de gestación en que se da la infección y de la cepa viral involucrada (Bielefeldt *et al.*, 1982). Se puede sugerir que los cabritos que desarrollan la forma de encefalitis, pudieran ser animales infectados *in útero*, esta hipótesis requiere estudios posteriores, ya que las alteraciones patológicas ocasionadas por AEC se deben principalmente a la respuesta inmune contra el virus (Bertoni 2007). No se ha reportado la generación de inmunotolerancia en cabritos provenientes de madres seropositivas, y los resultados obtenidos en este estudio, de los fetos positivos y los sospechosos, muestran que algunos son capaces de generar anticuerpos a partir del segundo tercio de la gestación (Ver gráfica 1). Se puede descartar que los anticuerpos detectados sean de origen materno ya que el tipo de placentación de los rumiantes evita el paso de macromoléculas de la madre al producto y viceversa (Fahey *et al.* 1978). Se reporta que la principal respuesta humoral en los fetos es de la clase IgM y en menor medida IgG (Talmage *et al.*, 1979; Parsonson *et al.*, 1981). La técnica de ELISA indirecta utilizada en este trabajo, detecta principalmente IgG, por lo tanto existe la posibilidad de que un mayor número de fetos hubieran montado una respuesta inmune contra el virus, pero no pudieron ser detectados por la técnica utilizada. Se deben realizar estudios mas profundo sobre este tema.

En fetos infectados con VIF se ha detectado la presencia de IgG mediante la técnica de ELISA, únicamente cuando los títulos de anticuerpos maternos son altos, es decir, cuando se encuentran en etapas iniciales la infección de la madre (Weaver *et al.*, 2005); en AEC la respuesta humoral fetal es completamente independiente del estado inmunológico de la madre, por el tipo de placentación. En VIF se sabe que existe una fuerte inmuosupresión en fases finales de la enfermedad, ya que al igual que en el VIH, se destruye la subpoblación de Linfocitos T CD4+ (Tompkins *et al.*, 2008), lo cual puede explicar por que la mayor parte de

fetos felinos infectados no presentan anticuerpos contra el VIF u otros agentes patógenos (O'Neil *et al.*, 1995). Sin embargo, se ha demostrado que AEC no causa inmunodeficiencia, aunque las células afectadas son los monocitos y macrófagos (Peluso *et al.* 1988). La infección en estas células ocasiona una desregulación que hace que la respuesta inmune se dirija hacia Th2, estimulándose la producción de anticuerpos en forma importante (Lechner *et al.*, 1997), aunque se desconoce en la actualidad si así ocurre en el feto caprino.

7.0 Conclusiones.

- Se demostró la presencia del virus de artritis encefalitis caprina en las células epiteliales de vesícula seminal, glándula bulbouretral y ámpula, pudiendo considerarse estas como un reservorio del virus que aporte partículas al semen
- Se demostró la presencia de antígeno viral y provirus de AEC en células epiteliales de glándulas accesorias mantenidas *in vitro*, sugiriendo que estas pueden ser permisivas a la replicación viral.
- Es posible cultivar células epiteliales de las glándulas accesorias de machos caprinos para la realización de estudios de infectividad viral.
- Se detectó la presencia de anticuerpos contra el virus de artritis encefalitis caprina en fetos, lo cual indica que tuvieron contacto con antígenos virales durante la gestación, y que es posible la transmisión transplacentaria del virus, sin embargo, se requieren mas estudios a este respecto.

8.0 Referencias Bibliograficas.

- Abelson M.L., Schoborg R.V. Characterization of the caprine arthritis encephalitis virus (CAEV) rev N-terminal elements required for efficient interaction with the RRE. *Virus Research*. 2003; 92: 23-35.
- Adams D.S., Crawford T.B. CAE: a viral arthritis encephalitis syndrome in goats. *Int. Goats and Sheep Reseach*. 1980;1:168-172.
- Adams D.S., Klevjer-Anderson P., Carlson J.L., McGuire T.C., Gorham J.R. Transmission and control of caprine arthritis–encephalitis virus. *Am. J. Vet. Res.* 1983; 44, 1670–1675.
- Afshar A. Bluetongue: Laboratory diagnosis. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*. 1994; 17: 221-242.
- Ali Al Ahmad M.Z., Fieni F., Martignat L., Chatagnon G., Baril G., Bouvier F., Chebloune Y. Proviral DNA of caprine arthritis encephalitis virus (CAEV) is detected in cumulus oophorus cells but not in oocytes from naturally infected goats. *Theriogenology*. 2005; 64: 1656-1666.
- 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 virus (CAEV) in semen and in genital tract tissues of male goat. *Theriogenology*. 2008; 69: 473-480.
- Anderson V.M. The placental barrier to maternal HIV infection. *Obstetrics and Gynecology Clinics of North America*. 1997; 24(4): 797-820.
- Baba S.S., Fotabe A.I., Baba M.M., Rimstad E. Preliminary survey for antibodies against caprine arthritis-encephalitis virus (CAEV) using recombinant GAG proteins: studies among small ruminant populations in north-eastern Nigeria. *Small Ruminant Research*. 2000; 37: 137-140.
- Bertoni G. Caprine Arthritis Encephalitis Complex. [www.ivis](http://www.ivis.org). 24-Jul-2007. Documento No.A0902.0707
- Beyer J.C., Chebloune Y., Lakhel-Mselli L., Hötzel I., Mcwhirter-Kumpula N., Cheevers W.P. Immunization with plasmid DNA expressing the caprine arthritis –encephalitis virus envelope gene. Quantitative and qualitative aspects of antibodies response to viral surface glycoprotein. *Vaccine*. 2001;19: 1643-1651.
- Bielefeldt O.H., Jensen M.H., Sorensen K.J., Dalsgaard K. Experimental Fetal Infection with Bovine Viral Diarrhea Virus I. *Virological and Serological Studies. Can. J. comp. Med.* 1982; 46: 357-362.

Bishop S.A., Stokes C.R., Gruffydd-Jones T.J., Whiting C.V., Harbour D.A. Vaginal and rectal infection of cats with feline immunodeficiency virus. *Veterinary Microbiology*. 1996; 5(1): 217-227.

Blacklaws, B.A., Berriatua, E., Torsteinsdottir, S., Watt, N.J., de Andres, D., Klein, D., Harkiss, G.D. Transmission of small ruminant lentiviruses. *Veterinary Microbiology* 2004; 101: 199–208.

Bruett L., Barber S.A., Clements J.E. Characterization of a membrane associated protein implicated in visna virus binding and infection. *Virology*. 2000; 271: 132-141.

Casal J., Learte P., Torre E. A path model of factors influencing bovine leukemia virus transmission between cattle herds. *Preventive Veterinary Medicine*. 1990; 10: 47-61.

Chebloune Y. Cross species infection of small ruminant lentiviruses. Proceedings of 26th World Veterinary Congress, Lyon, Francia, 23-26 de septiembre 1999.

Choi K.Y., Monke D., Stott J.L. Absence of bovine leukosis virus in semen of seropositive bulls. *J Vet Diagn Invest*. 2002; 14: 403–406.

Clavijo A., Thorsen J. Application of polymerase chain reaction for the diagnosis of caprine arthritis-encephalitis. *Small. Rum. Res*. 1996; 22: 69-77.

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

Cork, L.C., Hadlow, W.J., Crawford, T.B., Gorham, T.R., Piper, R.C. Infectious Leukoencephalomyelitis of young goats. *J. Inf. Dis*. 1974;129:134-141.

Cutlip R.C., Lehmkuhl H.D., Whipp S.C., McClurkin A.W. Effects on ovine fetuses of exposure to ovine progressive pneumonia virus. *Am. J. Vet. Res*. 1982; 43: 82–85.

Daltabuit, M.T., De la Concha-Bermejillo, L.E.L., Loza,R.E.E and Aguilar, S.A. Isolation of caprine arthritis encephalitis virus from goats in Mexico. *Can. J.Vet.Res*. 1999; 3, 212-215.

Dawson, M.. Pathogenesis of maedi-visna. *Veterinary Record*, 1987;120: 451-454.

De Andres D., Klein D., Watt N.J., Berriatua E., Torsteinsdottir S., Blacklaws B.A., Harkiss G.D. Diagnostic test for small ruminant lentiviruses. *Veterinary Microbiology*. 2005; 107: 49-72.

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.

Diario oficial de la Federación de la Federación México.1999.

Delèzay O., Yahi N., Tamalet C., Baghdiguian S., Boudire J.A., Fantini J. Direct effect of type 1 human immunodeficiency virus (HIV-1) on intestinal epithelial cell differentiation: Relationship to HIV-1 enteropathy. *Virology*. 1997; 238: 231–242.

DiMaria H., Courpotin C., Rouzioux C., Cohen D., Rio D., Boussin F. Transplacental transmission of human immunodeficiency virus. *Lancet*. 1986; i:215–216.

Dus Santos M.J., Memorias del XX Congreso Panamericano de Ciencias Veterinarias. Santiago de Chile. 13 al 16 de Noviembre de 2006.

Dus Santos M.J., Trono K., Lager I., Wigdorovitz A. Development of a PCR to diagnose BLV genome in frozen semen samples. *Veterinary Microbiology*. 2007; 119: 10–18.

Fahey, K.J., Morris, B., Humoral immune responses in foetal sheep. *Immunology*. 1978; 135, 651-661.

Fields B.N., Knipe D.M., Howley P.M. Retroviridae and their replication. In: *Fundamental Virology*. 2nd Edition. Raven Press Ltd. USA. 1991: 645-708.

Fieni, F., Rowe, J., Van Hoosear, K., Burucoa, C., Oppenheim, S., Anderson, G., Murray, J., BonDurant, R. Presence of caprine arthritis–encephalitis virus (CAEV) proviral DNA in genital tract tissues of superovulated dairy goat does. *Theriogenology* . 2003; 59:1515–1523.

Franks L.M. The growth of mouse prostate during culture *in vitro* in chemically defined and natural media, and after transplantation *in vivo*. *Experimental Cell Research*. 1961; 22: 56-72.

Franks L.M., Barton A.A. The effects of testosterone on the ultrastructure of the mouse prostate *in vivo* and in organ culture. *Experimental Cell Research*. 1960; 19: 35-50.

Freed E.O., Mouland A.J. The cell biology of HIV-I and other retroviruses. *Retrovirology*. 2006; 3:77-86.

Gay, G., Valdivieso, N., Tron, F., Enriquez, O. Informe preliminar del aislamiento del virus productor de la artritis encefalitis caprina en México. Memorias de la Reunión de Investigación Pecuaria en México-SARH. México D.F. 1986:215.

Gibbs E.P.J., Greiner E.C. The epidemiology of bluetongue. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 1994; 17: 207-220.

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

Greatorex J. The retroviral RNA dimer linkage: different structures may reflect different roles. *Retrovirology*. 2004;1: 22-31.

Grossi P., Giudice C., Bertolotti I., Cioccarelli G., Brocci E., Cammarata G., Gelmetti D. Immunohistochemical detection of the p27 capsid protein of Caprine Arthritis-Encephalitis Virus (CAEV) in bone-marrow cells of seropositive goats. *J. Comp. Path.* 2005, Vol. 133: 197-200

Harmache, A., Bouyac, M., Audoly, G., Hieblot, C., Peveri, P., Vigne, R., and Suzan, M. The vif gene is essential for efficient replication of caprine arthritis encephalitis virus in goats synovial membrane cells and affects the late steps of the virus replication cycle. *J. Virol.* 1995; 69:3247-3257.

Hizi, A., Herschhorn, A., Retroviral reverse transcriptases (other than those of HIV-1 and murine leukemia virus): A comparison of their molecular and biochemical properties, *Virus Res.* (2008), doi:10.1016/j.virusres.2007.12.008

Hotzel I, Cheevers WP. 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.

International Classification Taxonomy of Viruses (ICTV). 2005. The Eight Report. URL: www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/ICTVdb/61064001.htm

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

Kalinski H., Yaniv A., Mashiah P., Miki T., Tronick S.R., Gazit A. Rev-like transcripts of caprine arthritis encephalitis virus. *Virology*. 1991, 183: 786-782.

Kemp R.K., Knowles D.P., Perry L.L. McGuire T.C., Besser T.E., Cheevers W.P. Crossreactive neutralizing antibodies induced by immunization with caprine arthritis encephalitis virus surface glycoprotein. *Vaccine*. 2000; 18: 1282-1287.

Kirkland P.D., Batty E.M. Caprine arthritis-encephalitis virus: an efficient method for large scale production of serological antigens. *J. Virol. Methods*. 1987; 16:323-326.

Kirkland P.D., Richards S.G., Rothwell J.T., Stanley D.F. Replication of bovine viral diarrhoea virus in the bovine reproductive tract and excretion of virus in semen during acute and chronic infections. *Veterinary Record*. 1991; 128: 587-590.

Knowles D.P., Cheevers W., McGuire T., Steam T., Gorham J. Severity of arthritis is predicted by antibody response to GP 135 in Chronic infection with caprine arthritis encephalitis virus. *J. Virol.* 1990: 2396-2398.

Knowles, D.P., Everman, J.F., Shropshire, C., Chalie, J.V., Bradway, D., Gezon, H.M., Cheevers, W.P. Evaluation of agar gel immunodiffusion serology using caprine and ovine lentiviral antigens for detection of antibodies to caprine arthritis-encephalitis virus. *J.Clin Microbiol.* 1994;32.1:243-245.

Knowles D.P. Laboratory diagnostic test for retrovirus infections of small ruminants. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice.* 1997; 13(1): 1-11.

Krogstad J., Udnes H. Maedi (progressive interstitial pneumonia of sheep). Diagnosis, epizootiology, prevention and control programme in Norway. *Bull. Off. Int. Epiz.* 1978; 89: 451-464.

Kwang J., Keen J., Cutlip R.C., Kim H.S., Bermejillo A. Serological diagnosis of caprine lentivirus infection by recombinant immunoassays. *Small Rum. Res.* 1995; 16: 171-177.

Lamara, A., Fieni, F., Mselli-Lakhal, L., Tainturier, D., Chebloune, Y. Efficient replication of caprine arthritis-encephalitis virus in goat granulosa cells. *Virus Research.* 2001; 79: 165-172.

Lamara A., Fieni F., Mselli-Lakhal L., Tainturier D., Chebloune Y. Epithelial cells from goat oviduct are highly permissive for productive infection with caprine arthritis-encephalitis virus (CAEV). *Virus Research.* 2002; 87 (1): 69-77.

Le Tortorec A, Le Grand R, Denis H, Satie A-P, Mannioui K. Infection of Semen - Producing Organs by SIV during the Acute and Chronic Stages of the Disease. *PLoS ONE* 2008; 3(3): e1792.

Lechner F., Machado J, Bertoni G., Seow H.F., Dobbelaere D.A. Peterhans E. Caprine arthritis encephalitis virus dysregulates the expression of cytokines in macrophages. *J. Virol.* 1997; 71:7488-7497.

Lerondelle, C., Fleury, C., Vialard, J. The mammary gland: target organ for infection with the caprine arthritis and encephalitis virus. *Ann. Réch. Vét.* 1989; 20, 57-63.

Lerondelle, C., Greenland, T., Jane, M., Mornex, J.F. Infection of lactating goats by mammary instillation of cellborne caprine arthritis-encephalitis virus. *J. Dairy Sci.* 1995; 78, 850-855.

Lynget O. Studies on reproduction in the goat. *Acta Vet. Scand.* 1971; 12: 185-201.

Martínez, H.A., Ramírez, H., Tórtora, J., Aguilar, A., Garrido, G.I. y Montaraz, J.A. Efecto del virus de artritis encefalitis caprina en el aparato reproductor de machos caprinos. *Vet. Méx.* 2005; 36(2): 159-175.

- McGuire, T. C. The immune response to viral antigens as a determinant of arthritis in caprine Arthritis-encephalitis virus infection. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 1987; 17: 465-470.
- Mermin J.H., Holodniy M., Katzenstein D.A., Merigan T.C. Detection of human immunodeficiency virus DNA and RNA in semen by polymerase chain reaction. *Journal of Infectious Disease*. 1991; 164:386-388.
- Miller C.J. Localization of Simian immunodeficiency virus-infected cells in the genital tract of male and female *Rhesus macaques*. *Journal of Reproductive Immunology*. 1998; 41: 331–339.
- Moore J.S., Rahemtulla F., Kent L.W., Hall S.D., Ikizler M.R., Wright P.F., Nguyen H.H., Jackson S. Oral epithelial cells are susceptible to cell-free and cell-associated HIV-1 infection in vitro. *Virology*. 2003; 313: 343–353.
- Mselli-Lakhal, L., Guiguen, F., Fornazero, C., Jian, D., Favier, C., Durand, J. Grezel, D., Balleydier, S., Mornex, J.F. Chebloune, Y. Goats milk epithelial cells are highly permissive to CAE infection in vitro. *Virology*. 1999; 259: 67-73.
- Murphy F.A., Gibbs E.P.J., Horzinek M.C., Studdert M.J. *Veterinary Virology*. Third Edition. Academic Press. USA. 1999: 364-373.
- Mylonakis, E., Paliou, M., Lally, M., Flanigan, T.P., Rich, J.D. Laboratory testing for infection with the human immunodeficiency virus: established and novel approaches. *Am. J. Med*. 2000; 109: 568–576.
- 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.
- Nash, J.W., Hanson, L.A., Coats, K.St.C. Bovine immunodeficiency virus in stud bull semen. *Am.J.Vet.Res*.1995;56:760-763.
- 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, C.S., Trigo, F.J., Suberbie, E., Madrigal. V. Estudio clínico-patológico de la artritis-encefalitis caprina en México. *Veterinaria Mex*. 1985;16: 91-96.
- Nisole S., Saïb A. Early steps of retrovirus replicative cycle. *Retrovirology*. 2004; 1: 9-28.
- O’Neil L.L., Burkhard M.J., Diehl L.J., Hoover E.A. Vertical transmission of feline immunodeficiency virus. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*. 1995; 1: 171–182.

- O'Neil L.L., Burkhard M.J., Diehl L.J., Hoover E.A. Frequent perinatal transmission of feline immunodeficiency virus by chronically infected cats. *J Virol.* 1996;70:2894-901.
- Parsonson I.M., Della-Porta A.J., O'halloran M.L., Snowdon W.A., Fahey K.J., Standfast H.A. Akabane virus infection in the pregnant ewe. 1. Growth of virus in the foetus and the development of the foetal immune response. *Veterinary Microbiology.* 1981; 6: 197-207.
- Peluso R., Haase A.T., Stowring L., Edwards M., Ventura P. A Trojan horse mechanism for the spread of visna virus in monocytes. *Nucleic Acids Res.* 1988;16:4173.
- Peretz, G., Asso, J., et Devillechaise.. Le C.A.E.V. *Revue des Connaissances actuelles et conséquences pratiques. Revue Med. Vet.* 1993;144,93-98.
- Perk K. Concealed Locations of Lentiviruses in Caprine Arthritis Encephalitis System. *Virology.* 1999; 253: 8-9.
- Peterhans E., Greenland T., Badiola J., Harkiss G., Bertoni G., Amorena B., Eliaszewicz M., Juste R.A., Krabnig R., Lafont J., Lenihan P., Petursson G., Pritchard G., Tholey J., Vitu C., Mornex J., Pepin M. Routes of transmission and consequences of small ruminant lentiviruses (SRLVs) infection and eradication schemes. *Vet. Res.* 2004; 35: 257–274.
- Peterson K., Brinkhof J., Howers D.J., Colenbrander B., Gadella B.M., Presence of pro-lentiviral DNA in male sexual organs and ejaculates of small ruminants. *Theriogenology.* 2008; 69: 433-442.
- Perrin G.G., Benoit C., Saunders M. Influence of storage and heating on sera in detection of CAEV antibodies. *Small Rum. Res.* 1998; 30: 153-155.
- Pétursson G., Andrésdóttir V., Andrésón Ó.S., Georgsson G., Pálsson P.A., Rafnar B., Torsteinsdóttir S. Lentivirus diseases of sheep and goat: Maedi-Visna and Caprine Arthritis-Encephalitis. In: *Progress in sheep and goat research.* Oxford: Speedy, A.W., 1992: 107-129.
- Pisoni, G., Quasso, A., Moroni. Phylogenetic analysis of small ruminant lentivirus subtype B1 in mixed flocks: Evidence for natural transmission from goats to sheep. *Virology.* 2005; 339: 147-152.
- Preziuso S., Sanna E., Sanna M.P., Loddo C., Cerri D., Taccini E., Mariotti F., Braca G., Rossi G., Renzoni G. Association of maedi visna virus with *Brucella ovis* infection in rams. *Eur. J. Histochem.* 2003; 47: 151–158.
- Ramirez-Mendoza H., Hernández-Jauregui P., Reyes-Leyva J., Centeno E., Moreno-Lopez J., Kennedy S. Lesions in the Reproductive Tract of Boars Experimentally Infected with Porcine Rubulavirus. *J. Comp. Path.* 1997; 117: 237-252.
- Ravazzolo, A.P., Reischak, D., Peterhans, E., Zanoni, R. Phylogenetic analysis of small ruminant lentiviruses from Southern Brazil. *Virus Res.* 2001; 79: 117–123.

Ravazzolo A.P., Nenci C., Vogt H.R., Waldvogel A., Obexer-Ruff G., Peterhans E., Bertoni G. Viral load, organ distribution, histopathological lesions, and cytokine mRNA expression in goats infected with a molecular clone of the caprine arthritis encephalitis virus. *Virology*. 2006; 350: 116–127.

Reddy P.G., Sapp W.J., Heneine W. Detection of caprine arthritis-encephalitis virus by polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* 1993; 31(11): 3042-3043.

Rimstad E., East N.E., Torten M., Higgins J., de Rock E., Pedersen N.C. Delayed seroconversion following naturally acquired caprine arthritis-encephalitis virus infection in goats. *Am. J. Vet. Res.* 1993; 54(11): 1858-1862.

Robinson, W.R., Ellis, T.M. Caprine arthritis-encephalitis virus infection: from recognition to eradication. *Aust. Vet. J.* 1986 ;63 (8).237-241.

Rogers A.B., Hoover E.A. Maternal-fetal feline immunodeficiency virus transmission: timing and tissue tropisms. *J Infect Dis.* 1998;178: 960-967.

Rolland M., Chauvineau C., Valas S., Mamoun R.Z., Perrin G. Establishment and characterization of a goat synovial membrane cell line susceptible to small ruminant lentivirus infection. *Journal of Virological Methods.* 2004; 118: 123-130.

Rowe, J.D., East, N. Risk factors for transmission and methods for control of caprine arthritis-encephalitis virus infection. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice.* 1997;13: 35-53.

Russo, P., Vitu, C., Fontaine, J.J. et Vignoni, M. Arthrite- encéphalite caprine : essai d'une préparation vaccinale adjuvée. I Étude clinique et virologique. *Com. Immun. Microbiol. infect. Dis.* 1993;16:131-136.

Saltarelli M.J., Schoborg R., Pavlakis G.N., Clements J.E. Identification of the Caprine Arthritis Encephalitis virus Rev protein and its Cis-acting Rev responsive element. *Virology.* 1994; 199: 47-55.

Sanna E., Sanna M.P., Vitali C.G., Renzoini G., Sanna L., Spano S., Rossi G., Leoni A. Proviral DNA in the brains of goats infected with caprine arthritis encephalitis virus. *J. Comp. Path.* 1999; 121: 271-276.

Schoborg R.V. Analysis of caprine arthritis encephalitis virus (CAEV) temporal gene expression in infected cells. *Virus Research.* 2002; 90: 37- 46.

Seroude V., Audoly G., Gluschkof P., Suzan M. Viral and cellular specificities of caprine arthritis encephalitis virus Vif protein. *Virology.* 2002; 292:156-161.

Shah, C., Böni, J., Huder, J.B., Vogt, H-R., Mühlherr, J., Zanoni, R., Miserez, R., Lutz, H., Schüpbach, 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. *Virology* . 2004; 319: 12–26.

Solis M., Ramirez-Mendoza H., Mercado C., Espinosa S., Vallejo V., Reyes-Leyva J., Hernández J. Semen alterations in porcine rubulavirus-infected boars are related to viral excretion and have implications for artificial insemination. *Research in Veterinary Science*. 2007; 83: 403–409.

Sprin-Mills E., Bush M., Hill C. Male mouse accessory sex glands in organ culture. *Archives of Andrology*. 1983; 10: 103-111

Steinberger A., Steinberger e., Perloff W.H. Mammalian Testes in Organ Culture. *Experimental Cell Research*. 1964; 36: 19-17.

Talmage T., Brown J.R., Ronald D., Schultz J., Duncan R., Bistner S.I. Serological Response of the Bovine Fetus to Bovine Viral Diarrhea Virus. *Infection and Immunity*. 1979; 25(1): 93-97

Thibier M. Y Guerin B. Hygienic aspects of storage and use of semen for artificial insemination. *Animal Reproductive Science*. 2000; 62:233-251.

Thomas F.C., Singh E.L., Hare W.C.D. Embryo Transfer as a Means of Controlling Viral Infections. Vi. Bluetongue Virus-Free Calves from Infectious Semen. *Theriogenology*. 1985; 24(3): 345-350.

Tompkins M.B., Tompkins W.A. Lentivirus-induced immune dysregulation. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 2008; 123: 45–55.

Travassos C.E., Benoit C., Valas S., Da Sila A.G., Perrin G. Caprine arthritis-encephalitis virus in semen of naturally infected bucks. *Small Rum Res*. 1999; 32 :101-106.

Turelli P., Guiguen F., Mornex J.F., Vigne R., Querat G. dUTPase-minus caprine arthritis encephalitis virus is attenuated for pathogenesis and accumulates G-to-A substitutions. *J. Virol*. 1997; 71; 6: 4522-4530.

Valas S., Benoit C., Baudry C., Perrin G., and Mamoun, R.Z. Variability and immunogenicity of caprine arthritis encephalitis virus surface Glycoprotein. *J. Virol*. 2000; 74(13): 6178-6185.

Vitu C., Russo and P., Vignoni M. Arthrite Encephalite Caprine: Essai D'une préparation vaccinale adjuvée-II. Etude de la réponse anticorps. *Comp.Imm.Microbiol.Infect.Dis*. 1993 ;16,2 :137-144

Voges H., Horner G.W., Rowe S., Wellenberg G.W. Persistent bovine pestivirus infection localized in the testes of an immuno-competent, non-viraemic bull. *Veterinary Microbiology*. 1998; 61:165-175.

Wagner E.K., Hewlett M.J. Retroviruses: Converting RNA to DNA. In: *Basic Virology*. Blackwell Science INC. USA 1999: 383-405.

Wai-sum O., Chen H., Chow P.H. Male genital tract antioxidant enzymes—Their ability to preserve sperm DNA integrity. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2006; 250: 80–83.

Weaver D.M., Tyler J.W., Van Metre D.C., Hostetler D.e., Barrington G.M. Passive transfer of calostr al immunoglobulins in calves. *J. Vet. Intern. Med*. 2000; 14: 569-577.

Weaver C.C., Burgess S.C., Nelson P.D., Wilkinson M., Ryan P.L., Nail C.A., Kelly-Quagliana K.A., May M.L., Reeves R.K., Boyle C.R., Coats K.S. Placental Immunopathology and Pregnancy Failure in the FIV-infected Cat. *Placenta*.2005; 26: 138-147.

Wilkerson, M.J., Davis, W.C. Cheevers, W.P. Peripheral blood and synovial fluid mononuclear cell phenotypes in lentivirus induced arthritis. *J.Rheumatol*. 1995;22,1:8-15.

Zanoni R., Krieg A., Peterhans E. Detection of antibodies to caprine arthritis encephalitis virus by protein g enzyme-linked immunosorbent assay and immunoblotting. *J. Clin. Microbiol*. 1989; 27(3): 580-582.

Zanoni, R.G., Vogt, H.R., Pohl, B., Bottcher, J., Bommeli, W. and Peterhans. E. An ELISA based on whole virus for the detection of antibodies to small-ruminat lentivirus. *J.Vet.Med. B.41*.1998: 662-669.

Zink MC, Yager JA, Myers JD. Pathogenesis of Caprine Arthritis Encephalitis Virus - Cellular Localization of Viral Transcripts in Tissues of Infected Goats. *Am.J.Pathol*. 1990;136:843-54.