



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTILÁN**

Cinética de la expresión de proteínas de Lentivirus  
de Pequeños Rumiantes (LvPR)

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**MÉDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA**

P R E S E N T A:

**YESICA VIRGINIA TORRES DURÁN**

**ASESOR:**

**DR. HUMBERTO ALEJANDRO MARTÍNEZ RODRÍGUEZ**

**COASESORA:**

**M en C MARIA MARTHA GARCÍA FLORES**

CUAUTILÁN IZCALLI, EDO DE MÉXICO.

2011



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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



**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN  
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR  
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES**

**ASUNTO: VOTO APROBATORIO**

**DRA. SUEMI RODRÍGUEZ ROMO  
DIRECTORA DE LA FES CUAUTITLÁN  
PRESENTE**

**ATN: L.A. ARACELI HERRERA HERNÁNDEZ  
Jefa del Departamento de Exámenes  
Profesionales de la FES Cuautitlán**

Con base en el Art. 28 del Reglamento de Exámenes Profesionales nos permitimos comunicar a usted que revisamos **LA TESIS:**

Cinética de la expresión de proteínas de Lentivirus de Pequeños Rumiantes (LvPR)

Que presenta la pasante: **Yesica Virginia Torres Durán**

Con número de cuenta: **300046917** para obtener el Título de: **Médica Veterinaria Zootecnista**

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

**ATENTAMENTE**

**“POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU”**

Cuautitlán Izcallí, Méx. a 21 de Septiembre de 2011.

**PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO**

	<b>NOMBRE</b>	<b>FIRMA</b>
<b>PRESIDENTE</b>	Dr. Humberto A. Martínez Rodríguez	
<b>VOCAL</b>	MC. Raúl Arturo Mar Cruz	
<b>SECRETARIO</b>	Dr. José Francisco Morales Álvarez	
<b>1er SUPLENTE</b>	Dr. Hugo Ramírez Álvarez	
<b>2do SUPLENTE</b>	MVZ. Edna Maribel Legaspi Nuevo	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 120).  
HHA/pm

## AGRADECIMIENTOS

*A dios por permitirme realizar el sueño de mi vida, a mi ángel que se encuentra con el por la cual estoy en este mundo a mi madre Salustia Durán Ramírez que sin su esfuerzo, perseverancia y su ejemplo no estaría en estos momentos aquí.*

*A mi padre Aaron Torres del Rosario por ser siempre un ejemplo de perseverancia y responsabilidad, por estar siempre a mi lado apoyándome en todas mis locuras y alentándome a cumplir mis sueños.*

*A mis hermanos Francisco, Claudia, Griselda, Carolina, Carlos, Ana Laura y Marlene por su apoyo incondicional en todo momento durante todo el trayecto de mi vida y mi carrera. Sobre todo gracias por aguantar mis frustraciones, comprenderme y sobretodo estar siempre a mi lado.*

*A la Universidad por haberme dado la oportunidad y el gran honor de formar parte ella.*

*A mis sinodales por brindarme su tiempo para la revisión de este trabajo.*

*Al Dr. Alejandro Martínez por haberme abierto las puertas del laboratorio, al Dr. Hugo Ramírez por su apoyo y amistad.*

*A mis profesoras Dra. Martha García Flores y MVZ Ana Gonzáles por haber creído en mi siempre, por compartir sus conocimientos, brindarme su amistad y apoyarme incondicionalmente, espero no defraudarlas.*

*A todos los que forman parte del equipo del Laboratorio de Virología y uno que otro colado a Lulu, Alma, Fito, Chelo, Marco, Gaby, Rodrigo, Flor, Itz, Carmen, Chos, Miguel y Oscar. Gracias a todos por su amistad y apoyo sin ustedes mi estancia en el laboratorio no seria igual, mil gracias por hacerme sentir parte del grupo.*

*A mis amigos que han estado a mi lado desde que empecé la construcción de este sueño que compartimos juntos a Norma, Nelly, Delman, Dulce, Neto, Gaby Margarita, Susanita, Adriana, Victor, Claudia, David y a mis grandes amigas del CCH Ibeth, Jessica, Pilar, Priscila y Nadia por escucharme, aconsejarme, apoyarme y aguantarme tantos años.*

*Al Dr. Álvaro Aguilar Setién del Laboratorio de Inmuno-Virología de la Unidad de Investigación Médica en Inmunología de la UMAE Hospital de Pediatría del CMN Siglo XXI. IMSS por haberme permitido trabajar en sus instalaciones y a su grupo de trabajo Mony, Hayde, Leo, Memo, Nidia y Vero gracias por apoyarme y aguantarme tanto tiempo.*

*También a las personas que me ayudaban a empezar el día con una buena taza de café y una calida bienvenida desde el primer día que pise el hospital al Dr. Gímenez, Giovanita, Paty, Sarita, Vicky, Carmelita, Charly, Misael, Fer y Berenice.*

*Quise terminar con una frase celebre pero no se me ocurre ninguna solo esta vino a mi mente,*

**MIL GRACIAS A TODOS**

## ÌNDICE

RESUMEN.....	1
1. INTRODUCCIÓN.....	2
1.1 Agente etiológico.....	2
1.1.1 Genes estructurales.....	2
1.1.2 Genes reguladores.....	4
1.2 Replicación viral.....	4
1.3 Variabilidad genética.....	7
1.4. Tropismo celular de LvPR.....	10
1.5 Transmisión.....	10
1.6 Patogenia.....	11
1.7 Respuesta inmune.....	12
1.8 Signos clínicos.....	14
1.9 Diagnóstico de laboratorio.....	15
1.9.1 Prueba de inmunodifusión en agar gel (IDAG) .....	16
1.9.2 Ensayo Inmunoenzimático (ELISA).....	16
1.9.3 Western blot.....	17
1.9.4 Inmunohistoquímica.....	18
1.9.5 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	18
1.9.6 Hibridación <i>in situ</i> .....	18
1.9.7 Cultivo celular.....	18
1.10 Diagnóstico diferencial.....	19
1.11 Control.....	20
1.11.1 Vacunación .....	20
2 JUSTIFICACIÓN.....	22
3 OBJETIVOS.....	23
3. 1 Objetivo general.....	23
3.2 Objetivos particulares.....	23
4 HIPÓTESIS.....	24
5 MATERIALES Y MÉTODOS.....	25
5.1 Células.....	25
5.2 Virus.....	26

5.3 Cinética de Producción de una cepa de LvPR Silvestre en células de Membrana Sinovial de Feto Caprino MSFC infectadas.....	26
6 RESULTADOS.....	28
7 DISCUSIÓN.....	34
8 CONCLUSIONES.....	37
9 BIBLIOGRAFÍA.....	38

## ÍNDICE DE CUADROS

1.-Tabla 1. Clasificación taxonómica de los Retrovirus.....	3
2.-Cuadro 2. Clasificación de LvPR basada en el tipo genético considerando las regiones genéticas gag y pol.....	9
3.-Tabla 3. Células susceptibles a la infección por LvPR.....	19
4 Tabla 4.Resultados de las pruebas de diagnóstico practicadas a 12 cabras.....	28
con cuadro clínico de AEC	
5.-Tabla 5.Sincicios observados en la cepa silvestre y EV1.....	31

## ÍNDICE DE FIGURAS

1.-Figura 1. Morfología y estructura de Lentivirus de Pequeños Rumiantes.....	5
2.-Figura 2. Ciclo de replicación de los Retrovirus.....	6
3.-Figura 3. Evolución de la infección de LvPR.....	12
4.-Figura 4.Células de MSFC multinucleadas después de 7 días de co-cultivo con macrófagos.....	29
5.- Figura 5.Células de MSFC multinucleadas después de la infección con la cepa de referencia EV1 (origen ovino).....	30
6.- Figura 6. Relación entre la presencia de sincicios y proteínas virales evaluadas por WB del virus silvestre de LvPR aislado en el rebaño caprino de la FES-Cuautitlán.....	32
7.- Figura 7. Relación entre la presencia de sincicios y proteínas virales de la cepa de referencia EV1 (de origen ovino) de LvPR.....	33



## RESUMEN

El diagnóstico de Lentivirus de Pequeños Rumiantes (LvPR) en México se realiza principalmente por serología mediante inmunodifusión en agar gel (IDAG) y/o ELISA indirecta. Las pruebas son importadas y el antígeno utilizado en éstas es extraído de cultivos celulares o son proteínas virales recombinantes. El objetivo de este trabajo fue replicar un LvPR silvestre, obtenido de una cabra naturalmente infectada y determinar el tiempo óptimo de producción viral. Se obtuvo una provisión de virus a partir de macrófagos de sangre periférica co-cultivados con células de membrana sinovial de feto caprino (MSFC). Se llevó a cabo una cinética de crecimiento viral a los días 3, 5, 7, 14 y 21 en células MSFC infectadas con una suspensión concentrada del virus y se determinó el tiempo de aparición de sincicios. Se semipurificó el virus de los sobrenadantes de las células infectadas mediante un colchón de sacarosa. Las proteínas del virus ya lisado por acción de RIPA, ácido dioxicolico y *B2* mercapto etanol fueron separadas en un gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (PAGE-SDS) al 12% y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa para realizar un Western blot (Wb). Los resultados obtenidos muestran la presencia de sincicios a los días 7, 14 y 21 encontrándose un mayor número de sincicios y núcleos por célula al día 14. Asimismo se identificaron proteínas de 45, 66 y 135 kDa durante todo el experimento y una de 28 kDa sólo al día 21. Además cuando se encontró el mayor número de sincicios se observó una mayor intensidad de las proteínas virales en el Wb. Se concluye que al día 14 post-infección se obtiene la mayor producción de antígeno de LvPR silvestre y podría ser utilizado en el diagnóstico de LvPR en México.

## 1. INTRODUCCIÓN

La Artritis Encefalitis Caprina (AEC) y la Neumonía Progresiva Ovina o Maedi-Visna (MV) son enfermedades infecciosas causadas por Lentivirus de Pequeños Rumiantes (LvPR) (Narayan *et al.*, 1993; Kim *et al.*, 2004).

La AEC ha sido descrita en Estados Unidos, Canadá, Australia, Francia, Nueva Zelanda, Suiza, Kenia, Gran Bretaña y México, entre otros países. Tiene el riesgo de difundirse a otras regiones a través el comercio internacional de caprino (Trigo *et al.*, 1999; Baba *et al.*, 2000).

El MV fue descrito por primera vez en Sudáfrica, en 1915; posteriormente se reportó en los Estados Unidos de Norteamérica en 1923 y 15 años después en Islandia. A partir de entonces la infección se ha reportado en la mayoría de los países en donde se crían ovinos incluyendo Bélgica, Canadá, Francia, Alemania, Holanda, España, Italia, Grecia, Hungría, Bulgaria, Rumania, Suiza, Israel, Kirguisa, Rusia , Kenia, India, Sudáfrica, Estados Unidos y Perú (Nord *et al.*, 1998; Sáenz , 2005 ).

### 1.1 Agente Etiológico

Los LvPR pertenecen a la Familia: Retroviridae, Subfamilia: Orthoretrovirinae del género Lentivirus (Tabla1). Poseen una forma icosaédrica, miden de 80-130 nm de diámetro, son virus que contienen una envoltura lipídica y un genoma de ARN de cadena sencilla; tienen 3 genes estructurales que del extremo 5' al 3' del genoma se denomina *gag*, *pol* y *env*; cuenta con tres genes reguladores (*vif*, *vpr-like* y *rev*) y unas zonas ricas en sitios de unión a factores de transcripción denominadas LTR (Figura 1). (Murphy, 1999; Perdígones, 2004).

#### 1.1.1 Genes estructurales

El gen *gag* (Antígeno específico de Grupo) contiene información para tres proteínas, p25 (CA) proteína de la cápside, p14 (NC) proteína de la nucleocápside, p17 (MA) proteína de matriz que une la cápside y la envoltura. El gen *pol* (Polimerasa) contiene la

información necesaria para la síntesis de transcriptasa inversa (RT) que permite la transcripción del ARN vírico en ADN (Perdigones, 2004; Saltarelli *et al.*, 1990).

Tabla 1. Clasificación Taxonómica de los Retrovirus

FAMILIA	SUBFAMILIA	GÉNERO	ESPECIE
Retroviridae	Orthoretrovirinae	Alfaretrovirus	Virus del Carcinoma Aviar Mill Hill tipo 2 Virus de la Leucosis Aviar Virus de la Mieloblastosis Aviar Virus del Sarcoma Aviar CT10 Virus del Sarcoma Fujinami Virus del Sarcoma de Rous Virus del Sarcoma de UR2 Virus del Sarcoma Y73
		Betaretrovirus	Retrovirus Jaagsiekte del Borrego Virus de Langur Virus del Mono Mason-Pfizer Virus del Tumor Mamario del Ratón Retrovirus del Mono Squirrel
		Deltaretrovirus	Virus de la Leucosis Bovina Virus Linfotrópico-T del Primate 1,2 y 3
		Epsilonretrovirus	Virus del Sarcoma Epidermal de Walleve Virus de la Hiperplasia Epidermal del Walleve 1 y 2
		Gammaretrovirus	Virus Leucemia Felina Virus del Sarcoma Murino Virus del Sarcoma Felino Virus de la Leucemia del Mono Oncovirus tipo-C del Cerdo de Guinea
		<b>Lentivirus</b>	Virus de la Inmunodeficiencia Bovina <u>Virus Maedi-Visna</u> <u>Virus de la Artritis Encefalitis Caprina</u> Virus de Anemia Infecciosa Equina Virus de la Inmunodeficiencia Felina Virus de la Inmunodeficiencia Humana 1 y 2
	Spumaretrovirinae	Spumavirus	Virus Espumoso del Bovino Virus Espumoso del Equino Virus Espumoso del Felino Virus Espumoso del Macaco Virus Espumoso del Simio

(ICTV, 2009)

La proteasa (PR) actúa sobre los precursores proteicos para escindir las proteínas, endonucleasa y la integrasa (IN) la cual permite la inserción del ADN vírico en el ADN de la célula hospedera DUTPasa, lo que disminuye la frecuencia de las mutaciones de guanina a adenina (Groner *et al.*, 1982; Clavijo *et al.*, 1996).

El gen *env* (Envoltura) codifica la glicoproteína gp160. En el interior de la célula hospedera, la gp160 se une a la glicoproteína de superficie gp135 (SU) de un extremo que sobresale de la partícula vírica; entonces la gp45 (glicoproteína de transmembrana TM) se encarga de anclar a la gp135 a la envoltura (Saltarelli *et al.*, 1990; Pepin *et al.*, 1998).

### 1.1.2 GENES REGULADORES

El gen *tat* (transactivador) codifica para las llamadas proteínas transactivadoras. Éste es indispensable para la replicación viral tanto *in vivo* como *in vitro*. Este gen procesa funciones como la capacidad de bloquear el proceso del ciclo celular en la fase G (2). Aunque frecuentemente se cree que las funciones que realiza son más parecidas al gen *vpr* (vp-like) el gen *vif* (factor viral de infección) codifica una proteína reguladora llamada factor de infectividad viral, gracias a la cual las partículas víricas adquieren su poder infectante. El gen *rev* (regulador de la expresión de proteínas virales) produce una proteína de 19 kDa capaz de atravesar la membrana celular que transporta ARN mensajero del núcleo al citoplasma, haciendo al ARNm viral disponible para la traducción. Este gen es indispensable para la replicación viral (Saltarelli *et al.*, 1990; Murphy *et al.*, 1999).

### 1.2 REPLICACIÓN VIRAL

Cuando la partícula vírica entra en contacto con una célula susceptible, se produce un anclaje de la gp135 (SU) con los receptores celulares, produciéndose la fusión entre la membrana celular y la envoltura vírica. Tras esta fase de adsorción y penetración, la nucleocápside queda liberada en el citoplasma y es entonces cuando comienza el proceso de retrotranscripción. En el citoplasma de la célula del hospedero la transcriptasa inversa transcribe el ARN vírico en una doble cadena de ADN, prolongando ambos extremos del genoma vírico con las LTR, consiguiendo penetrar en el núcleo celular. Posteriormente, la endonucleasa/integrasa inserta la copia de dicho ADN en el ADN de la célula. Cuando el genoma viral está integrado en el genoma

hospedador recibe el nombre de provirus (Saltarelli *et al.*,1990; Mselli-Lakhal *et al.*, 2000).

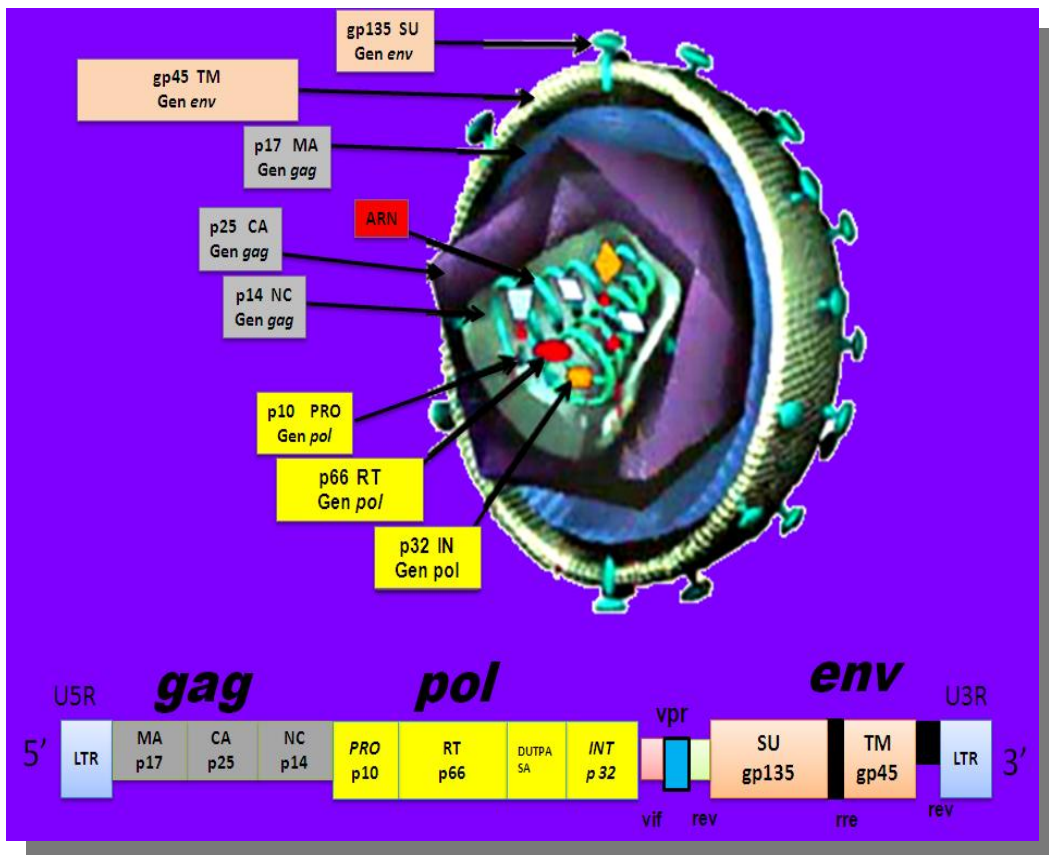


Figura 1 .Morfología y estructura de los Lentivirus de Pequeños Rumiantes

p: proteína, gp: glicoproteína, gag: antígeno específico de grupo, pol: polimerasa, env: envoltura, Vif: factor de infectividad viral, Tat: transactivador, Rev: Regulador de la expresión de proteínas virales, Int:integrasa, MA: matriz, CA: cápside, NC: nucleocápside, SU: superficie, PRO: proteasas, RT:transcriptasa inversa y INT: integrasa/ endonucleasa, Tomada de Ramírez (2002).

La zona en la cual se localiza el punto de integración es aleatoria y cada célula sólo integra una copia del genoma vírico (Petursson *et al.*, 1976; Narayan *et al.*, 1993).

El provirus queda completamente estable dentro del genoma celular y dependiente de la maquinaria de transcripción celular, propiciando una producción viral baja. Más tarde, las llamadas proteínas transactivadoras, codificadas por el gen *tat*, pueden incrementar los niveles de expresión del virus (Groner *et al.*, 1982; Cann *et al.*, 1997).

La mayor parte de las proteínas codificadas por *gag* y *pol* se sintetizan en los polirribosomas libres del citoplasma celular a partir de una molécula completa de ARN, mientras que las proteínas de la envoltura lo hacen en el retículo endoplásmico rugoso quedando unidas a la bicapa de la membrana celular (Kim *et al.*, 2004; Dunham, *et al.*, 2008).

El ensamblaje se da cuando el precursor *gag* se une por su extremo carboxi-terminal (futura proteína NC) con el ARN genómico y por su región media (futura proteína CA) con otras proteínas víricas, por su extremo amino terminal (futura proteína MA) con la membrana celular. Al mismo tiempo, las proteínas de la superficie, que ya se encuentran en la estructura de la membrana celular del retículo endoplásmico rugoso, se incorporan al conjunto y se libera por gemación una partícula vírica inmadura. Tras una proteólisis final en la propia partícula vírica, el virión madura (Quérat *et al.*, 1999; Perdígones, 2004).

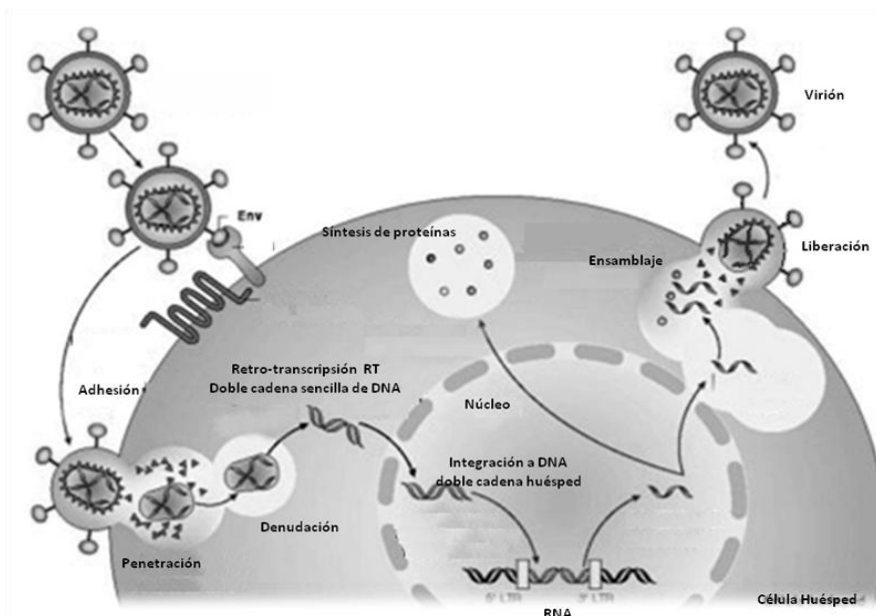


Figura 2. Ciclo de replicación de los Retrovirus

Modificado de Zapata *et al.*, 2006.

### 1.3 VARIABILIDAD GENÉTICA

La replicación viral conlleva una alta frecuencia de mutaciones puntuales, no obstante los genes *gag*, *pol* y ciertas partes del gen *env* están conservados. Sin embargo, otras partes del gen *env*, principalmente en las regiones que codifican los sitios en donde se unen los anticuerpos, son altamente variables. También existe una elevada frecuencia de recombinación entre genomas de retrovirus en células doblemente infectadas, dando lugar a las llamadas cuasiespecies, las cuales se definen como una población de variantes antigénicas entre las cuales sólo una predomina. Su presencia se atribuye a que la polimerasa del ARN tiene altos porcentajes de errores y carece de mecanismos de corrección; esto influye directamente en el tamaño y en la integridad de la cuasiespecie, teniendo como resultado una gran heterogeneidad genética. El tipo de virus que infecta originalmente a la célula persiste en el animal, coexistiendo con las nuevas variantes. Esta variabilidad no es sólo un instrumento del virus para evadir la respuesta inmune del hospedador, si no también puede estar involucrado entre las infecciones cruzadas entre ovinos y caprinos. Existen estudios de transmisión bidireccional de los LvPR en hatos mixtos de ovejas y cabras seropositivas a CAEV y también se ha aislado este mismo virus en hatos de únicamente ovejas (Morin *et al.*, 2003; Shah *et al* 2004; Erhouma *et al.*, 2008).

La existencia de una gran variabilidad genética en los LvPR ha dado como consecuencia un gran número de estudios que describen las relaciones filogenéticas entre ellos, siendo una herramienta que permite estudiar la relación histórica entre los genes virales, tratando de establecer un ancestro común. Basados en las secuencias genéticas de *gag* y *pol* de diferentes aislados, se ha dividido a los LvPR en cinco grupos genéticos designados con las letras A -E, los cuales difieren genéticamente entre un 25% y 37% entre si y éstos, a su vez, se dividen en subgrupos para el caso de los tipos A, B y E. Se han descrito nueve subtipos para el tipo A, de A1 - A9; para el tipo B, se han identificado tres subtipos, de B1 – B3; finalmente para el subtipo E se han descrito dos subtipos E1 y E2 (Shah *et al.*, 2004).Tabla 2.

En México se han reportado estudios de secuenciación en pequeños rumiantes y se ha detectado infección cruzada entre ovejas y cabras por LvPR en un rebaño mixto, encontrando que el virus que circulaba en el rebaño pertenece al subtipo de B1,

comúnmente identificado en cabras, compatible con virus del tipo artritis y caprinos encefalitis (VAEC) el cual se pensaba que solo se presentaba en cabras (Ramírez *et al.*, 2010).



Cuadro 2. Clasificación de LvPR según el tipo genético considerando las regiones genéticas gag y pol (Sahah *et al.*, 2004, Reina *et al.*, 2006, Reina *et al.*, 2009 Gjerse *et al.*, 2009, Park JE *et al.*., 2010,)

Grupo propuesto	A								
Subtipo	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9
Características	Virus parecido a MV de Francia aislado de caprinos y ovinos.	Aislado en Norte América de ovinos	Aislado en Portugal, Suiza y Sudáfrica de caprinos y ovinos.	Aislado en suiza de caprinos y ovinos.	Aislado en Suiza de caprinos.	Aislado en el sur de Francia del caprinos y ovinos.	Aislado en Suiza de caprinos	Aislado en Italia de caprinos	Aislado en Italia de ovinos

Grupo propuesto	B			C	D	E	
Subtipo	B1	B2	B3			E1	E2
Características	Aislado en Portugal, España Suiza , Sudáfrica, China y Corea de caprinos y ovinos	Aislado de ovinos del sur de Francia y España	Aislado de ovinos en Italia.	Aislado de cabra y ovinos en Noruega	Identificado en ovinos en España y Suiza	Aislado en Italia de caprinos	Aislado en Italia de caprinos

#### 1.4 TROPISMO CELULAR DE LvPR

Los miembros pertenecientes al género Lentivirus presentan diferencias en el tropismo celular y en el desarrollo de la enfermedad, por lo que se distribuyen en dos grupos: el primero comprende al Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH), Virus de la Inmunodeficiencia del Simio (VIS) y Virus de la Inmunodeficiencia Felina (VIF), los cuales se replican en macrófagos, causando un síndrome de inmunodeficiencia adquirida y una enfermedad órgano-específica afectando pulmones, sistema nervioso central (SNC) y tracto gastroentérico. El segundo grupo está formado por El Virus de la Anemia Infecciosa Equina (VAIE) y Lentivirus de Pequeños Rumiantes (VAEC y VMV); en éstos, el virus se replica predominantemente en macrófagos, infecta a linfocitos y causa una enfermedad órgano-específica en glándula mamaria, SNC, pulmón y articulaciones (Zapata *et al.*, 2006; Reina *et al.*, 2009; Mochizuki H *et al.*, 2011).

#### 1.5 TRANSMISIÓN

El virus se transmite principalmente por vía calostrada. La transmisión se ve favorecida por el reclutamiento de células mononucleares infectadas en la glándula mamaria. De este modo, la cría puede ser infectada con su primera toma de calostro, ya que su intestino presenta una alta permeabilidad a los productos ingeridos en las primeras horas de vida (Blacklaws *et al.*, 2004).

Otras fuentes de infección son por agua de bebida y/o comida contaminada con secreciones corporales y aerosoles. Se presentan frecuentemente en animales en condiciones de hacinamiento donde la sobrepoblación del corral y la mala ventilación pueden facilitar la exposición al virus; no se descarta la “transmisión iatrogénica” que se da por el uso de agujas infectadas y tatuadores (Blacklaws, *et al.*, 2004., Pisoni, *et al.*, 2007).

El ambiente uterino se sospecha como una manera de infección para el feto ya que se han reportado casos en los que varios animales recién nacidos separados de la madre al momento del nacimiento, alimentados con leche pasteurizada y sustitutos de leche presentaron infección; asimismo, se ha podido aislar el virus de corderos obtenidos por

cesárea , aun después de haberlos mantenido aislados por 8 a 9 meses, encontrando una seroconversión (Cuplin *et al.*, 1981;Blacklaws *et al.*,2004; Reina *et al.*, 2009).

Algunos autores sugieren la presencia del virus en células mononucleares en el semen y esto puede verse facilitado en procesos inflamatorios como los ocasionados por la presencia de la bacteria *Brucella ovis* co-infectando el tracto reproductor del macho, causando una epididimitis atrayendo a la zona de inflamación leucocitos y macrófagos infectados. Asimismo, existen estudios recientes que han demostrado la eliminación intermitente de ADN proviral de LvPR en el semen, que junto a el contacto hembra-macho, pueden ser un factor relevante en la transmisión. (Blacklaws *et al.*, 2004; Martínez *et al.*, 2004; De la Concha, *et al.*, 2006; Reina *et al.*, 2008).

## 1.6 PATOGENIA

Las infecciones por lentivirus son crónicas y generalmente transcurren varios años entre el momento de la infección y la manifestación de signos clínicos; Anteriormente se pensaba que estos virus producían una infección latente sin existir replicación viral por largos periodos de tiempo. Recientemente se ha estudiado en animales recién nacidos el virus proveniente del calostro. Este virus pasa a las células mononucleares como provirus en las placas de Peyer y posteriormente viaja a ganglios mesentéricos vía linfática (Brodie *et al.*, 1994; Pretziuso *et al.*, 2004).

Las células dendríticas juegan un papel importante en la transferencia del virus al tejido linfoide, viajando por la linfa aferente hasta los ganglios correspondientes, en donde el virus puede replicarse y pasar al torrente sanguíneo, distribuyéndose a diferentes órganos (Nayaran *et al.*, 1987; Ramírez, 2010).

En el animal infectado se estimula el sistema inmune dando lugar a la síntesis de anticuerpos, produciendo seroconversión. Tras una viremia inicial, la infección entra en un periodo de latencia que puede durar semanas o meses. Posteriormente el virus al replicarse puede ser captado por células presentadoras de antígenos.

Éstas últimas se rodean de linfocitos a los que presentan los epítomos, dando lugar a focos de inflamación con infiltración linfocitaria que se observan en tejidos blancos las cuales inducen la aparición de signos (Petterhans *et al.*, 2004; Gjerset *et al.*, 2007).Figura3.

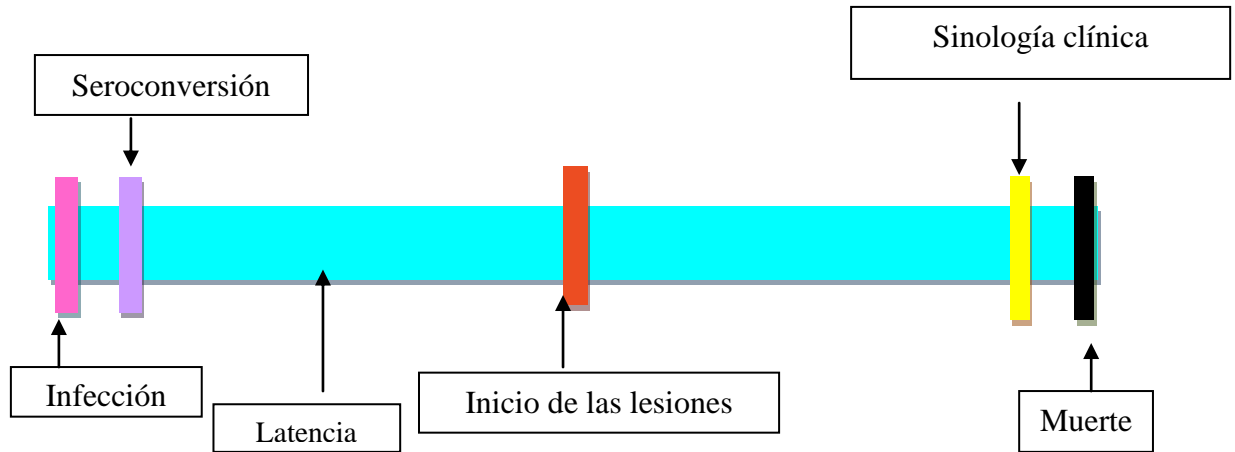


Figura 3. Evolución de la infección de LvPR

Tomado de Ramírez 2010.

### 1.7 RESPUESTA INMUNE

La respuesta inmune puede ser a mediano y /o largo plazo, mediante procesos inflamatorios que pueden facilitar la persistencia del virus en el hospedero y aumentar los efectos patológicos del virus. Las células blanco son las de la línea monocito-macrófago, junto con las células dendríticas. Estas células son las primeras en captar antígenos y presentarlo a los linfocitos T específicos. La infección en el macrófago puede causar una inadecuada repuesta en el sistema inmune, no sólo hacia los LvPR, sino también a otros patógenos (Zink *et al.*, 1987; Ding *et al.*, 1997).

La maduración de monocito a macrófago está asociada normalmente con infiltración a los tejidos, la cual esta íntimamente relacionado con un aumento de replicación viral. Sin embargo, las células infectadas en forma latente (monocitos) son capaces de diseminar el virus a diferentes órganos, permitiendo eludir la respuesta inmune del hospedador. A este mecanismo se le denomina “El caballo de Troya” (Pétursson *et al.*, 1985; Van Maanen *et al.*, 2010).

La respuesta humoral, induce la síntesis de anticuerpos específicos fijadores del complemento y neutralizantes. Los primeros anticuerpos en aparecer, ya sea por una infección natural o experimental, son los anticuerpos precipitantes, siendo la detección de estos anticuerpos entre las semanas 1 y 8 post infección. Los anticuerpos neutralizantes se detectan entre el primero y quinto mes post-infección, asimismo se ha demostrado que los virus altamente citolíticos producen una mayor respuesta de anticuerpos neutralizantes (Sihvonen *et al.*, 1981; Klein *et al.*, 1985; Pepin *et al.*, 1998).

Sin embargo se considera que los anticuerpos neutralizantes no son eficientes para eliminar la enfermedad, ya que los LvPR tienen una alta capacidad de mutación que propicia la aparición de variantes antigénicas. Asimismo, algunos epítomos virales pueden ser “secuestrados” por moléculas de carbohidratos y pasar desapercibidos por el sistema inmune del hospedador (Kennedy *et al.*, 1986; Ramírez ,2010).

La respuesta celular se presenta entre 1 y 4 semanas post infección y vuelve a los niveles basales después de 4 semanas. Este reconocimiento es posible gracias al complejo mayor de histocompatibilidad, las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de tipo II se encuentran en las células presentadoras de antígeno (CPA), tales como las células dendríticas, fagocitos mononucleares o linfocitos B (LB). Como respuesta al reconocimiento de los complejos antígeno-CMH, los LT CD4+ se generan estímulos para la proliferación y diferenciación de linfocitos T y linfocito B (Griffin *et al.*, 1978; Perdigones., 2004).

Los LT CD8+ ejercen su función destructiva frente a células infectadas vía péptidos asociados a las moléculas del complejo mayor CMH tipo I y (Narayan *et al.*, 1983; Tosrsteinsdottir *et al.*, 2007).

En los órganos blanco aumenta el CMH I, CMH II y linfocitos T CD8+, cuando hay mayor expresión de antígeno, ya que favorece la expresión del virus a las células T, provocando una linfocitosis proliferativa (Carey *et al.*, 1993; Lujan *et al.*, 1995)

Como se mencionó, la infección por lentivirus en pequeños rumiantes produce una alteración en la producción de interleucinas, las cuales estimulan células efectoras y diferencia linfocitos. La interleucina tipo 2 (IL-2) actúa de forma autócrina, pues es

sintetizada por el LT CD4+ que actúa sobre sí mismo como factor de crecimiento. Los macrófagos alveolares, (en cuyo interior se replican los LvPR ), incrementan la expresión del ARNm de IL-8, de tal forma que a mayor cantidad de IL-8, mayor la lesión pulmonar (Watt *et al.*, 1992; Legastelois *et al.*, 1998).

Los linfocitos T, al interactuar con macrófagos infectados, producen un interferón que parece ser específico de LvPR ovino (Narayan, *et al.*, 1985). Dicho interferón retrasa la maduración de los monocitos infectados a macrófagos, pero, al mismo tiempo es quimiotáctico para los linfocitos y aumenta la expresión de moléculas de clase II en macrófagos, los cuales sintetizan proteínas capaces de aumentar la transcripción de ARN vírico. El aumento de este interferón está relacionado con las lesiones producidas por los LvPR (Narayan *et al.*, 1983; Hermann *et al.*, 2007).

## 1.8 SIGNOS CLÍNICOS

Se describen cuatro principales presentaciones clínicas:

A) Forma nerviosa: afecta con mayor frecuencia a los cabritos de dos a cuatro meses de edad; se caracteriza por debilidad inicial del tren posterior y ataxia que afecta a una o ambas piernas, seguidas por cuadriplejía y reflejos pupilares anormales. En ovejas aparece en animales mayores a dos años, mostrando retraso en la marcha a causa de incoordinación en el movimiento e inestabilidad, lo que provoca caídas múltiples, llegando incluso a producirse la parálisis de las extremidades posteriores y anteriores. El animal se encuentra siempre alerta y responde a estímulos externos; no se observan cambios en el consumo del alimento (Dawson, 1979; Trigo, 1991; Matthews, 1999).

B) Forma artrítica: Afecta más comúnmente a cabras adultas (mayores de un año de edad), presenta generalmente cojeras y articulaciones aumentadas de tamaño. El virus lesiona todas las membranas sinoviales incluyendo las articulaciones, tendones y bursas. En ovejas mayores de dos años se presenta inflamación de las articulaciones de los carpos, cadera y la fémorotibiarotuliana, clínicamente se caracteriza por la aparición de cojera, engrosamiento de las articulaciones, sobre todo las del carpo y tarso y adelgazamiento crónico. (Oliver *et al.*, 1981; Narayan *et al.*, 1985).

C) Forma mamaria: Afecta tanto a ovinos como a caprinos, se observa en animales de entre tres y cinco años, aunque en algunos casos puede reconocerse desde el año de vida. Si el proceso es únicamente mamario, el curso clínico es prolongado ya que no suele causar la muerte del animal. El signo clínico más evidente es la presencia de una mastitis in-durativa difusa, bilateral, crónica, no dolorosa que se acompaña de un aumento de tamaño de los nódulos linfáticos retromamarios. Las lesiones provocan una disminución en la producción de leche que puede evolucionar hasta agalactia (Houwers *et al.*, 1988; De la Concha *et al.*, 2006).

D) Forma respiratoria: es común en ovinos, los síntomas clínicos se desarrollan de forma insidiosa; la enfermedad no resulta evidente hasta los 4 o 5 años de edad, los animales afectados presentan una pérdida de peso gradual, dificultad respiratoria que evoluciona lentamente y en sus inicios puede ser visible solamente después del ejercicio. La tos y el flujo nasal se pueden presentar en casos avanzados; se produce una dilatación de los ollares, extensión del cuello para abrir la boca como consecuencia del problema respiratorio (Dawson *et al.*, 1980; Petterhans *et al.*, 2004; Gjerset *et al.*, 2007).

## 1.9 DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO

Los anticuerpos producidos frente a las infecciones por lentivirus no protegen contra la enfermedad, sin embargo son indicadores de la infección. Entre las principales técnicas serológicas que se han empleado para el diagnóstico de anticuerpos en los LvPR se incluyen la Inmunodifusión en gel de agar (IDGA), el ensayo de inmuno absorbanza enzimática (ELISA), y el Western blot (Wb) para la detección de antígeno se han utilizado la inmunohistoquímica y para la detección de genes virales PCR e hibridación *in situ* (De Andrés *et al.*, 2005).

### 1.9.1 Prueba de Inmunodifusión en Agar Gel (IDAG)

Es la prueba serológica más utilizada para estudios de rutina para efectos de regulación específica por la OIE. Detecta anticuerpos contra el antígeno p25 del VMV , p28 en CAEV y gp135 de ambos, con una especificidad de 76,3% y 98,3% en comparación de ELISA que tiene un 20% de especificidad; La prueba consiste en detectar anticuerpos precipitantes en un medio de agar empleando antígeno viral soluble. La reacción Ag-Ac genera una línea blanca opaca de precipitado (OIE, 2004; De Andrés *et al.*, 2005).

### 1.9.2 Ensayo Inmunoenzimático (ELISA)

Las actuales pruebas de ELISA permiten una detección precoz de la infección y la valoración semicuantitativa de la tasa de anticuerpos, aunque para alcanzar este desarrollo actual han sufrido una evolución constante desde su descripción. Se distinguen varias generaciones de ELISA relacionadas con el tipo de conjugado y antígenos utilizados (Juste *et al.*, 2001; De Andrés *et al.*, 2005).

La primera generación utilizaba como antígeno virus completo procedente de sobrenadantes de cultivos virales altamente purificados, y como conjugado sueros policlonales. El principal problema era la aparición de falsos positivos al coexistir proteínas celulares copurificadas con las virales. Este problema se resolvía diluyendo la muestra, pero al mismo tiempo disminuía la sensibilidad resultando en falsos negativos (Howers *et al.*, 1982; De la Concha *et al.*, 2006).

La segunda generación de ELISA utilizaba antígenos de gran pureza obtenidos por recombinación del ADN en cultivos bacterianos de *Escherichia coli*, y el conjugado se componía de anticuerpos monoclonales. Entre las proteínas recombinantes que se utilizaban como antígenos destacaban las proteínas p25 (CA), y gp46 (TM) (Ortiz de Lejarazu *et al.*, 1998; Juste *et al.*, 2001).

La tercera generación utiliza oligopéptidos sintéticos de gran pureza estructural, mejorando la especificidad, pero disminuyendo la sensibilidad. Éstos son obtenidos de cápside y de envoltura (Saman *et al.*, 1999; Gil *et al.*, 2006; Reina *et al.*, 2009).



### 1.9.3 Western blot (Wb)

La técnica de Western blot se ha utilizado para analizar las respuestas de los anticuerpos hacia las proteínas virales gp135 (SU), gp 44 (TM), p25 (CA), p17 (MA) y p14 (NC) en suero de ovejas y cabras infectadas experimentalmente o de forma natural, observándose que se pueden originar resultados falsos positivos. La técnica de Western blot tiene un 80% de sensibilidad y especificidad, según algunos autores, más que la prueba de ELISA que tienen 20% de sensibilidad y especificidad, por lo que el WB resulta más útil como prueba confirmatoria (Saman *et al.*,1999; Celer *et al.* ,2001; D. de Andre´s *et al.*, 2005; Sánchez *et al*, 2005; Torsteinsdóttir S *et al* 2007;Ramírez, 2010).

En un estudio realizado en el estado de Querétaro y Estado de México se evaluaron 50 sueros de cabras resultando por ELISA un 66% positivo y 84% por Wb positivo. En otro estudio utilizando las mismas pruebas, pero a partir de 70 sueros de carneros de los estados de Puebla, Tlaxcala, Hidalgo, Estado de México y Zacatecas, se observó por ELISA un 10% de animales positivos y por Wb un 77%; en ambas pruebas de ELISAS fueron kits comerciales diferentes. En el caso de Wb se utilizaron proteínas autóctonas de LvPR reflejándose una mayor sensibilidad al aumentar el número de animales positivos (Cruz, *et al*, 2005, Pérez ,2005). Otro estudio que confirma la importancia de la utilización del Wb es el realizado por Ramírez (2002) en el que evaluó una cinética viral de proteínas antigénicas del virus de AEC y la mayor sensibilidad del Wb con respecto a las pruebas de ELISA e IDAG con un banco de sueros caprinos.

La cinética viral permite determinar el tiempo óptimo en el que se obtiene mayor cantidad de antígeno y la asociación con la presencia de células gigantes multinucleadas (Sincítios), Ramírez (2002) reporta que los mejores días para cosechar el antígeno son los días 7, 14 y 21 después de la infección (pi), Siamard *et al*,2001 al día 25 y Torres *et al.*, 2004 al día 7, confirmándose mediante la técnica de WB; estos estudios permitieron evidenciar proteínas virales como p16 , p14, gp 50, p25 y gp 135 ,que de LvPR.

#### 1.9.4 Inmunohistoquímica

Permite la detección de antígenos proteicos virales mediante anticuerpos específicos, en frotis y preparaciones de cortes histológicos; no son utilizadas para el diagnóstico de rutina en animales vivos por su baja sensibilidad (Amorena *et al.*, 1997; Reina *et al.*, 2009).

#### 1.9.5 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

El uso de la PCR con fines diagnósticos se ha estudiado desde los años 90 publicándose los primeros protocolos de la técnica para la detección de fragmentos de ácidos nucleicos de LvPR, considerándose una prueba sensible y específica para el diagnóstico de células infectadas. La desventaja de esta técnica es su poco uso en el diagnóstico rutinario a Lentivirus y variabilidad genética de los virus (Torres *et al.*, 2004; De Andrés *et al.*, 2005; Torsteinsdóttir *et al.*, 2007; Barquero *et al.*, 2011).

#### 1.9.6 Hibridación *in situ*

La hibridación *in situ* tiene importancia en preparaciones histológicas ya que permite detectar la presencia de ADN o ARN, pero sólo es empleada con fines de investigación en estudio de patogénesis viral (Zink *et al.*, 1999; Sanna *et al.*, 1999; Gil *et al.*, 2006; Reina *et al.*, 2009.)

#### 1.9.7 Cultivo celular

El aislamiento de LvPR en cultivos celulares se lleva a cabo adicionando células blancas de sangre de la línea monocito-macrófago, lavados bronco alveolares o macerados de tejidos de animales infectados; observándose un efecto citopático que consiste en la formación de sincitios, sincicio o cenocito (células gigantes multinucleadas), aunque en algunos casos puede no observarse bien, debido a que la cepa viral no induce un claro efecto citopático o bien porque el virus permanece latente (Sihvonen *et al.*, 1984; Torres *et al.*, 2004; Sanchez *et al.*, 2005; Pisoni *et al.*, 2010).

Las líneas celulares más utilizadas para el cultivo de LvPR son los fibroblastos de plexo coroideo de corderos, feto ovino, pulmón de ovino y membrana sinovial de cabra. Otro tipo de células utilizadas son las células corneales ovinas entre otras (Tabla 3).

Tabla 3. Células susceptibles a la infección de LvPR

Membrana sinovial de feto caprino	Crawford <i>et al</i> , 1981
Monocitos-macrófagos	Dahlberg <i>et al</i> , 1981
Plexo coroideo, pulmón y riñón	Cheveers <i>et al</i> , 1988
Bazo de feto de cordero	Belov y Walley <i>et al</i> , 1988
Células corneales	Brodi <i>et al</i> , 1992
Testículo de cabra	Guiguen <i>et al</i> , 2000
Células epiteliales de glándula mamaria	Mselli-Lakhal <i>et al</i> , 2000
Cultivo <sup>1º</sup> de células de la granulosa	Lamara <i>et al</i> , 2001
Cultivo <sup>1º</sup> de células de oviducto caprino	Lamara <i>et al</i> , 2001
Células endoteliales	Craig <i>et al</i> , 1997
Estroma de médula ósea	Grossi <i>et al</i> , 2005
Células epiteliales de prepucio	Rodríguez, 2009

#### 1. 10 DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL.

La forma pulmonar clínica de MV y AEC se debe diferenciar de enfermedades respiratorias crónicas como linfadenitis caseosa, neumonía supurativa crónica, neumonía verminosa y adenomatosis pulmonar ovina (Jaagsiekte). La mastitis se debe diferenciar de micoplasmosis crónica, así como de la forma artrítica de este agente. En sus estados iniciales, las formas neurológicas de MV o AEC se pueden confundir con listeriosis, Scrapie y migraciones parasitarias aberrantes ( Trigo, 1991; Matthews *et al.*, 1999 De la Concha *et al.*, 2006).

## 1.11 CONTROL

En la actualidad no existe tratamiento para las enfermedades causadas por los LvPR, por lo cual sólo se han implementado medidas de control, las cuales son:

- 1.-La aplicación de medidas zoonosanitarias, basadas en la eliminación de animales infectados.
- 2.-Monitoreo y determinación de la prevalencia de la enfermedad mediante pruebas de laboratorio como ELISA y PCR.
- 3.-Reemplazo total del rebaño infectado por animales libres de infección.
- 4.-Creación de un rebaño nuevo, separado del rebaño original infectado.
- 5.-Compra anual de animales de reemplazo libres de LvPR.
- 6.-Reemplazo a partir de hijas de hembras seronegativas (Palsson *et al.*, 1978; Houwers *et al.*, 1990; Nord *et al.*, 1998; De la Concha *et al.*, 2006; Reina *et al.*, 2009).

### 1.11.1 Vacunación

Se han desarrollado vacunas contra los LvPR de virus inactivado, atenuado, recombinantes, antidiotípicas, de subunidades y péptidos sintéticos. Los resultados obtenidos con estos inmunógenos han sido variables, como son: incremento de las lesiones, disminución de la carga viral, aumento en el tiempo de la lesión. La variación en la protección por anticuerpos de la vacuna de virus inactivado tiene un elevado riesgo de inducir la enfermedad. Sin embargo, vacunas más recientes presentan resultados favorables de forma experimental. A la fecha no existen vacunas de tipo comercial (Pearson *et al.*, 1989; Harmache *et al.*, 1998; Pepin *et al.*, 1998 ; Reina *et al.*, 2009; Ramírez, 2010).

La enfermedad de Maedi Visna forma parte de la lista de enfermedades y plagas exóticas de reporte obligatorio en México, ya que existe gran movilización de animales en el mercado tanto nacional como internacional, haciendo inminente el riesgo de que la enfermedad pueda introducirse y diseminarse en nuestro país (Diario Oficial de la Federación, México ,1999).

Por otro lado, el reporte de la artritis y encefalitis caprina no es requerido por ley. Éste depende de la voluntad del titular de los rebaños, ya que ésta es una enfermedad que una vez que se aloja dentro de una explotación es difícil de erradicar y causa estragos, como la disminución de ganancia de peso en los animales y baja de la producción láctea, resultado de la mastitis. Por tal motivo es de suma importancia el monitoreo frecuente para evitar la entrada de la enfermedad a los rebaños (Torsteinsdóttir *et al.*, 2007; Reina *et al.*, 2009).

## 2. JUSTIFICACIÓN

En México no se producen antígenos para ser utilizados en pruebas de diagnóstico que detecten anticuerpos a LvPR y el diagnóstico serológico sólo se realiza con pruebas comerciales importadas. En el presente estudio se pretende estandarizar una metodología para producir antígeno que al menos identifique proteínas estructurales codificadas por el gen *gag* (proteína de capsido p25, proteína de nucleocapsido p14 y proteína de matriz p17) y el gen *env* (proteína transmembranal gp 44 y proteína de superficie gp135) de LvPR a partir de una cepa autóctona, caracterizando las proteínas antigénicas por Wb para conocer si pueden ser apropiadas para ser utilizadas en pruebas diagnósticas.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar la cinética de producción de proteínas virales de una cepa silvestre de LvPR (de origen caprino) en células de membrana sinovial de feto caprino (MSFC).

#### 3.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- 1) Aislar y replicar una cepa silvestre de LvPR a partir de co-cultivos de células de la línea monocito-macrófago obtenidos de sangre periférica de cabras seropositivas infectadas naturalmente en células de MSFC.
- 2) Replicar una cepa de referencia EV1 de origen ovino en cultivos celulares de MSFC como control positivo.
- 3) Determinar las proteínas virales expresadas de cada una de las cepas de LvPR mediante la técnica de Wb.

#### 4. HIPÓTESIS

La producción máxima viral de una cepa silvestre de LvPR está relacionada con una mayor producción y detección de proteínas virales, aunado con la presencia del efecto citopático característico en células infectadas (sincicios). Por lo que, a partir de una cabra naturalmente infectada con LvPR, es factible aislar una cepa autóctona (silvestre) y replicar en células MSFC, permitiendo al virus producir en un periodo de 7 a 21 días sus principales proteínas virales, evidenciando éstas por medio de la prueba de Western blot .



## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo se realizó en colaboración con el Centro de Enseñanza Agropecuaria (CEA), Laboratorio de Virología, Genética y Biología Molecular del campo 4 de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán (FESC), UNAM y el Laboratorio de Inmuno-Virología de la Unidad de Investigación Médica en Inmunología de Alta Especialidad (UMAE) del Hospital de Pediatría del CMN Siglo XXI. IMSS.

### 5.1 Células

Se utilizaron cultivos primarios de células de membrana sinovial de feto caprino (MSFC) con un alto número de pases (34) que fueron proporcionadas por el Dr. Álvaro Aguilar Setién de la UMAE, IMSS. Las células se cultivaron en Medio Mínimo Esencial Glasgow enriquecido con 2mM de L-Glutamina, 1% de piruvatos, 1% de solución 1x de antibióticos/antimicótico (10 000 U de penicilina, 10 000 µg estreptomicina y 25 µg anfotericina / ml) y suplementado con 10 % de suero fetal bovino. Las células fueron amplificadas hasta obtener 7 botellas de 75cm<sup>2</sup>. La cantidad de células utilizadas para la infección fue de 9 x 10<sup>5</sup> células de MSFC /ml en 12 botellas de 75 cm<sup>2</sup>.

### 5.2 Virus.

El aislamiento viral de la cepa silvestre (de origen caprino) de LvPR, fue a partir de un grupo de 11 cabras del mismo hato naturalmente infectadas con, antecedentes clínicos y diagnosticadas por IDAG y ELISA indirecta (Martinez, 2009), del módulo caprino de la FESC UNAM. Del grupo de 11 cabras se seleccionaron tres, las cuales resultaron positivas a las pruebas antes mencionadas y una cabra que obtuvo resultados negativos se utilizó como control (Tabla 4), de las que se tomaron 20 ml de sangre periférica con anticoagulante heparina (1:10) y se procesaron siguiendo la técnica modificada descrita por Gorodezky, 2008. Las células mononucleares de sangre periférica (CMSP) se separaron usando un gradiente de densidad en medio líquido (Ficoll hypaque d = 1.077 ± 0.001, SIGMA). Las CMSP se cultivaron en medio RPMI (suplementado con SFB al 4%) y siguiendo la metodología de Campbell y Adams, (1992) se dejaron en cultivo por 14 días, para permitir la maduración de monocitos a macrófagos. Enseguida se co-

cultivaron con células de MSFC y se incubaron a 37° C en atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5%. Se monitorearon diariamente hasta que la infección se detectó por la aparición células gigantes multinucleadas y lisis celular, lo cual fue más evidente en el co-cultivo de una cabra con identificación 78, la cual fue seleccionada para el trabajar el proceso completo de aislamiento del virus silvestre. La caracterización del virus fue realizada como lo describe Ramírez 2002.

Con la finalidad de comparar el comportamiento viral en las células se usó un LvPR de referencia, la Cepa EV1 (de origen ovino), donada amablemente por la Dra. Beatriz Amorena-Zabalza del Instituto de Agrobiotecnología de la Universidad Pública de Navarra, España. Esta cepa fue propagada en células de MSFC, y el sobrenadante se colectó hasta que se observaron células gigantes multinucleadas y un 50% de lisis celular.

5.3 Cinética de producción de proteínas virales de la cepa silvestre de LvPR en células de MSFC infectadas.

Para el estudio de la cinética de producción de proteínas viales se utilizaron 6 botellas de 75 cm<sup>2</sup> con células de MSFC y un 60-70 % de confluencia que fueron infectadas con 1ml de sobrenadante de la cepa silvestre de LvPR en presencia de polybrene (8 mg/ml; Sigma Chemical Co.) durante 2 horas a 37° C, en atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5%.

El seguimiento de la evolución de la infección se realizó por la observación y conteo de células gigantes multinucleadas y los núcleos presentes en ellas. Luego los sobrenadantes de las células infectadas se colectaron respectivamente a los 3, 5, 7, 14 y 21 días post-infección (pi) y se congelaron a -70°C hasta su uso. Para semi purificar el virus dichos sobrenadantes fueron clarificados a 350 g por 15 minutos, éstos se colocaron sobre 5ml de sacarosa al 20% y fueron centrifugados a 43150 g por 3 hrs.. El virus obtenido en la pastilla de cada uno de los días del estudio fue lisado por acción de una mezcla de RIPA (0.05M tris HCl 0.15 M NaCl, 0.1% SD , 1% Triton X-100) , ácido dioxicolico y B2 mercapto etanol para obtener las proteínas virales (Ramírez 2002).

Las proteínas virales de cada una de estas muestras fueron separadas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 12% en condiciones desnaturalizantes (SDS-

PAGE). Posteriormente las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa según la técnica descrita por Towbin y Staehelin, 1979. Los sitios de unión inespecíficos de la membrana de nitrocelulosa fueron bloqueados con una solución de leche descremada al 5% con 0.2% de Tween 20, durante 2 hrs, a temperatura ambiente. Enseguida la membrana se lavó 5 veces y se incubó por 1 h a 37°C con el anticuerpo primario diluido 1:100 (suero de cabra positivo a LvPR previamente evaluado y utilizado en trabajos anteriores que reconoce a las proteínas antigénicas de 14, 16, 28,37, 44, 51, 66, 90 y 135 kDa teniendo como control positivo la cepa del ATCC 75673, Ramírez 2002, Martínez 2003, Martínez *et al*, 2005). Posteriormente se lavó nuevamente la membrana y se incubó durante 1 h a 37°C con un anticuerpo secundario (Rabbit Anti Goat IgG Fc Fragment Specific Peroxidase Conjugate, Calbiochem, Inc. Co.USA) diluido 1:1000. Finalmente la membrana de nitrocelulosa fue revelada utilizando como sustrato DAB (tetrahidrocloruro de 3,3'-diaminobenzidina). Los pesos moleculares aproximados de las proteínas virales que fueron reconocidas con el suero control positivo se determinaron siguiendo los cálculos descritos por Ramírez 2002, que consiste en determinar el número de milímetros por cada 1 kDa y luego se multiplicó por el número de milímetros que había recorrido cada proteína con inmunoreactividad positiva.

Una cinética similar a la previamente descrita se realizó para la cepa referencia EV1 y se utilizó un cultivo de células de MSFC no infectadas. Cada experimento se llevó a cabo por duplicado.

## 6. RESULTADOS

Los resultados de la prueba de IDAG obtenidos de la evaluación de 11 sueros de cabras, de las cuales 10 mostraron cuadro clínico artrítico, se muestran la tabla 4. La cabra que no mostró cuadro clínico compatible con la infección por LvPR ni resultado serológico positivo fue utilizada como control negativo. Fueron seleccionados 3 animales para aislar CMSP (47, 61 y 78) los cuales mostraron un cuadro compatible con la infección por LvPR y serología positiva. Finalmente se decidió establecer el co-cultivo para el estudio de la cinética de proteínas virales de la cepa silvestre con los CMSP de la cabra 78, ya que en dicho co-cultivo se identificaron la mayor cantidad de células multinucleadas por campo (de 3 a 4) después de 5-7 días de cultivo. Dichas células mostraron un mínimo de 10 y un máximo de 19 núcleos. Ver Figura 4.

Tabla 4. Resultados de las pruebas de diagnóstico practicadas a 12 cabras con cuadro clínico compatible con la infección de LvPR

Identificación del animal	Cuadro clínico asociado a LvPR	Resultado de la prueba serológica (IDAG)	ELISA indirecta
<b>44</b>	<b>Sin cuadro clínico</b>	<b>NEGATIVO</b>	<b>NEGATIVO</b>
41	ARTRITIS	NEGATIVO	NEGATIVO
<b>47</b>	<b><u>ARTRITIS</u></b>	<b><u>POSITIVO (2+)</u></b>	<b><u>POSITIVO</u></b>
<b>61</b>	<b><u>ARTRITIS</u></b>	<b><u>POSITIVO (1+)</u></b>	<b><u>POSITIVO</u></b>
67	ARTRITIS	NEGATIVO	NE
77	ARTRITIS	NEGATIVO	NEGATIVO
<b>78</b>	<b><u>ARTRITIS</u></b>	<b><u>POSITIVO (3+)</u></b>	<b><u>POSITIVO</u></b>
82	ARTRITIS	NEGATIVO	NE
94	ARTRITIS	NEGATIVO	NE
300	ARTRITIS	NEGATIVO	NE
375	ARTRITIS	NEGATIVO	NEGATIVO

IDAG=Inmunodifusión en agar gel

1+ = línea de precipitación tenue

2+ = línea de precipitación moderada

3+ = línea de precipitación intensa

NE= No evaluada

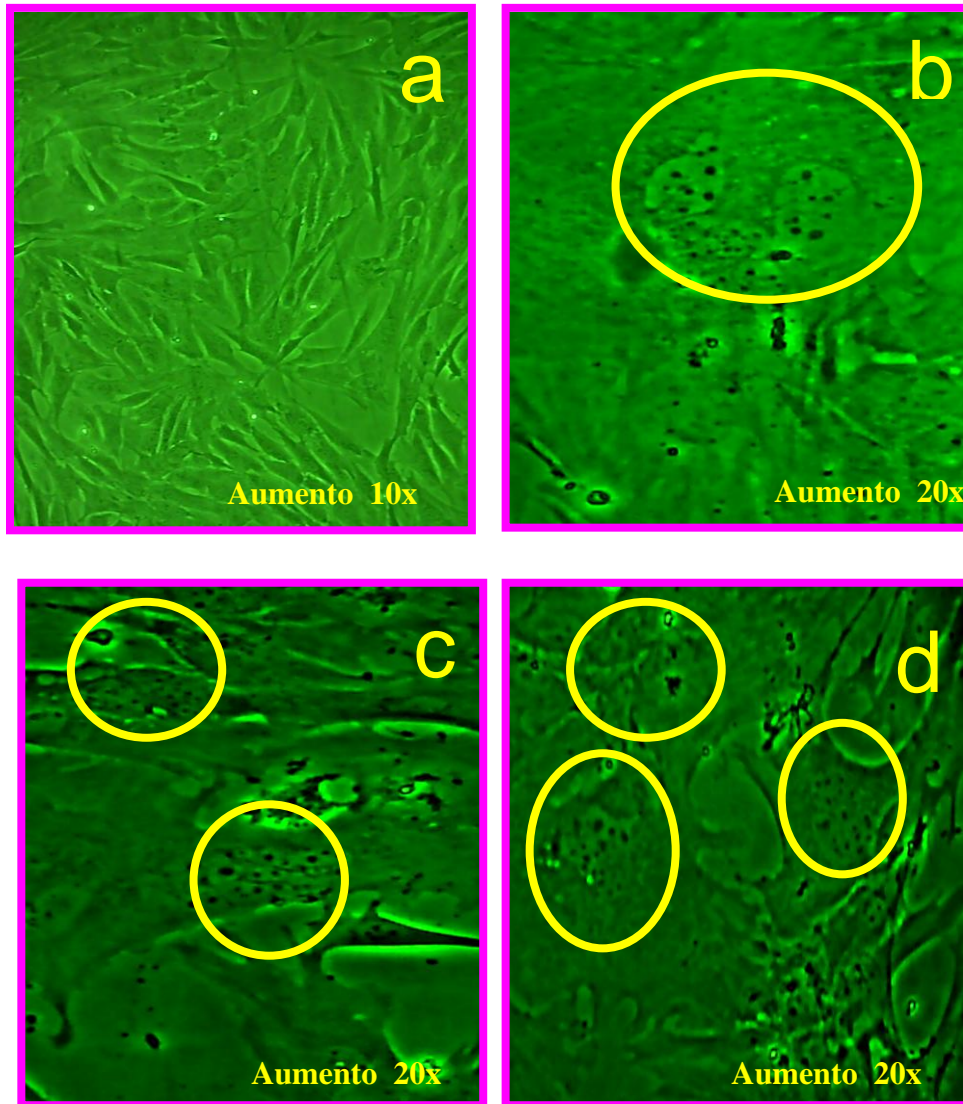


Figura 4. Células de MSFC multinucleadas después de 7 días de co-cultivo con macrófagos.

a) Cabra 44 control negativo, b) cabra 47 en la que se observa 1 célula multinucleada /campo con 7 núcleos, c) cabra 61 en la que se observan 2 células multinucleadas / campo con un mínimo de 10 y un máximo de 19 núcleos y (d) cabra 78 en la que se observan 3 células multinucleadas /campo con mínimo de 10 y máximo de 19 núcleos.

En las células de MSFC infectadas con la cepa EV1 (de origen ovino) se observaron de 3-4 células multinucleadas /campo con 28 o más núcleos cada una a los 5 días post-infección. Figura 5.

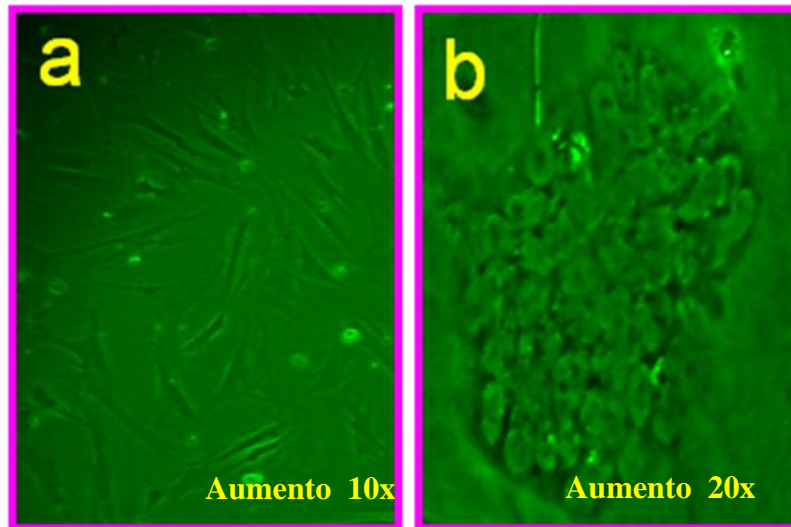


Figura 5. Células de MSFC multinucleadas después de la infección con la cepa de referencia EV1 (origen ovino).

- a) Células MSFC sin infectar.
- b) Célula gigante con 28 núcleos.

Cinética de producción de proteínas virales de la cepa de referencia EV1 y silvestre de LvPR.

De los cultivos celulares evaluados los días 3, 5, 7, 14 y 21 se observaron los siguientes resultados. Desde el día 7 al 21 post-infección se registró la aparición de células gigantes multinucleadas durante la infección con la cepa EV1, presentando 5 células por campo con 10 a 12 núcleos. Durante la infección con la cepa silvestre se registraron 3 células gigantes multinucleadas por campo, con 9 a 12 núcleos durante el mismo periodo de tiempo, siendo visible esta al día 14 p.i. Los núcleos estuvieron presentes hasta el último día de estudio, aunque la membrana nuclear ya no se observó definida. (Tabla 5).

Tabla 5. Sincicios observados en la cepa silvestre y EV1

Días post-infección	Cepa EV1		Cepa Silvestre	
	Sincicios/campo	Núcleos / célula	Sincicios/campo	Núcleos / célula
3	3	9	2	4
5	5	12	2	7
7	5	12	3	9
14	5	12	3	12
21	5	12	3	12
Control (-)	0	0	0	0

Para demostrar las diferentes proteínas virales que se produjeron durante la infección de células MSFC con los virus EV1 y silvestre de LvPR, se evaluó el sobrenadante cosechado a diferentes tiempos, reconociendo proteínas virales específicas utilizando Wb. La inmuno reacción reveló la presencia de proteínas, tanto para el virus de referencia como el silvestre, las cuales oscilaron entre un peso molecular de 135, 66, 45 kilodaltons (kDa) siendo fuertemente evidenciadas al día 5 y 14 pi respectivamente. En el caso de la cepa silvestre sólo se observó la proteína con un peso de 28 kDa al día 21 pi. La relación entre la presencia de efecto citopático (sincicios) y la producción de proteínas virales en ambas cepas se muestra en las figuras 6 y 7.

Figura .6 Relación entre la presencia de sincicios y proteínas virales evaluadas por WB del virus silvestre de LvPR aislado en el rebaño caprino de la FES Cuautitlán

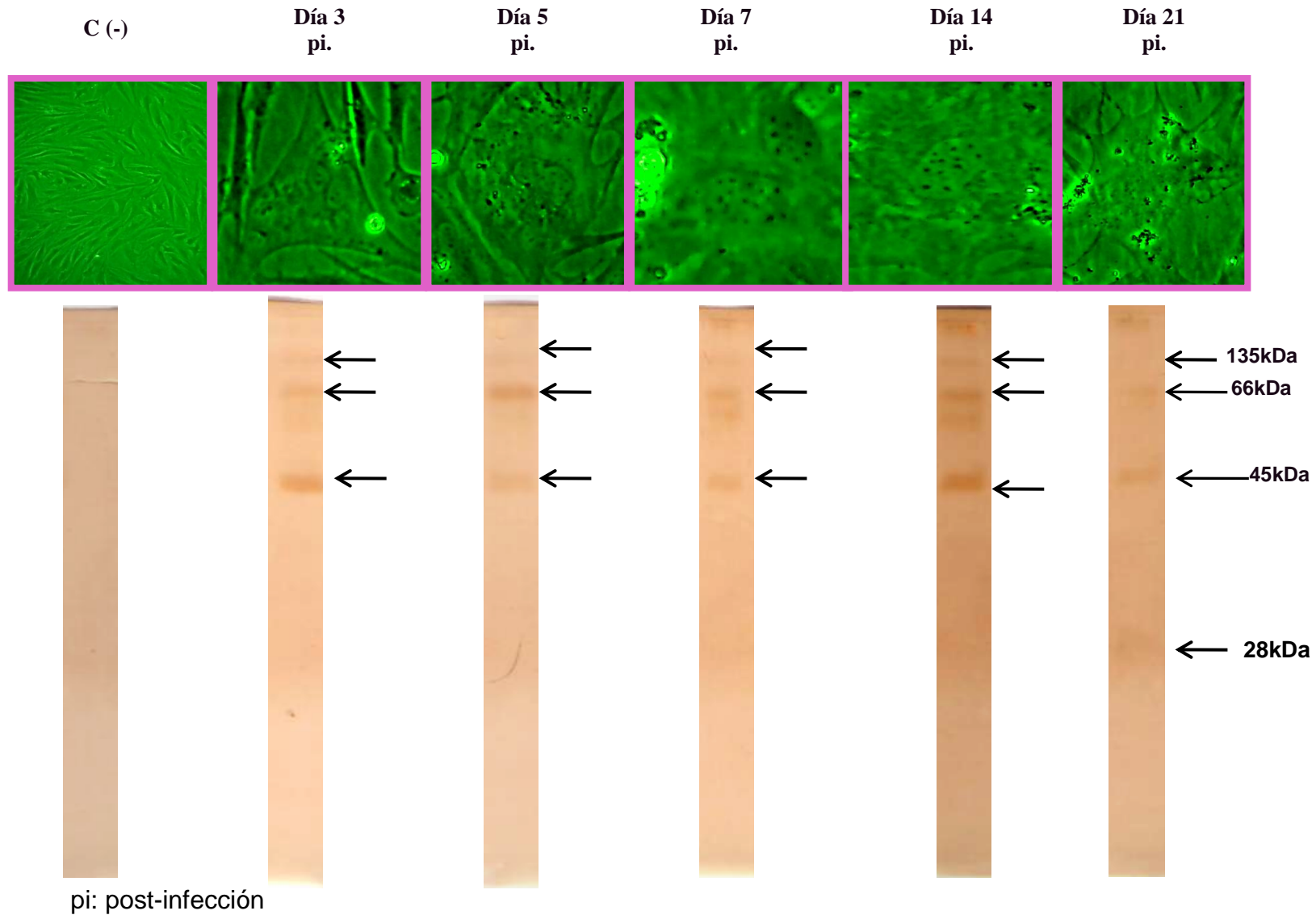
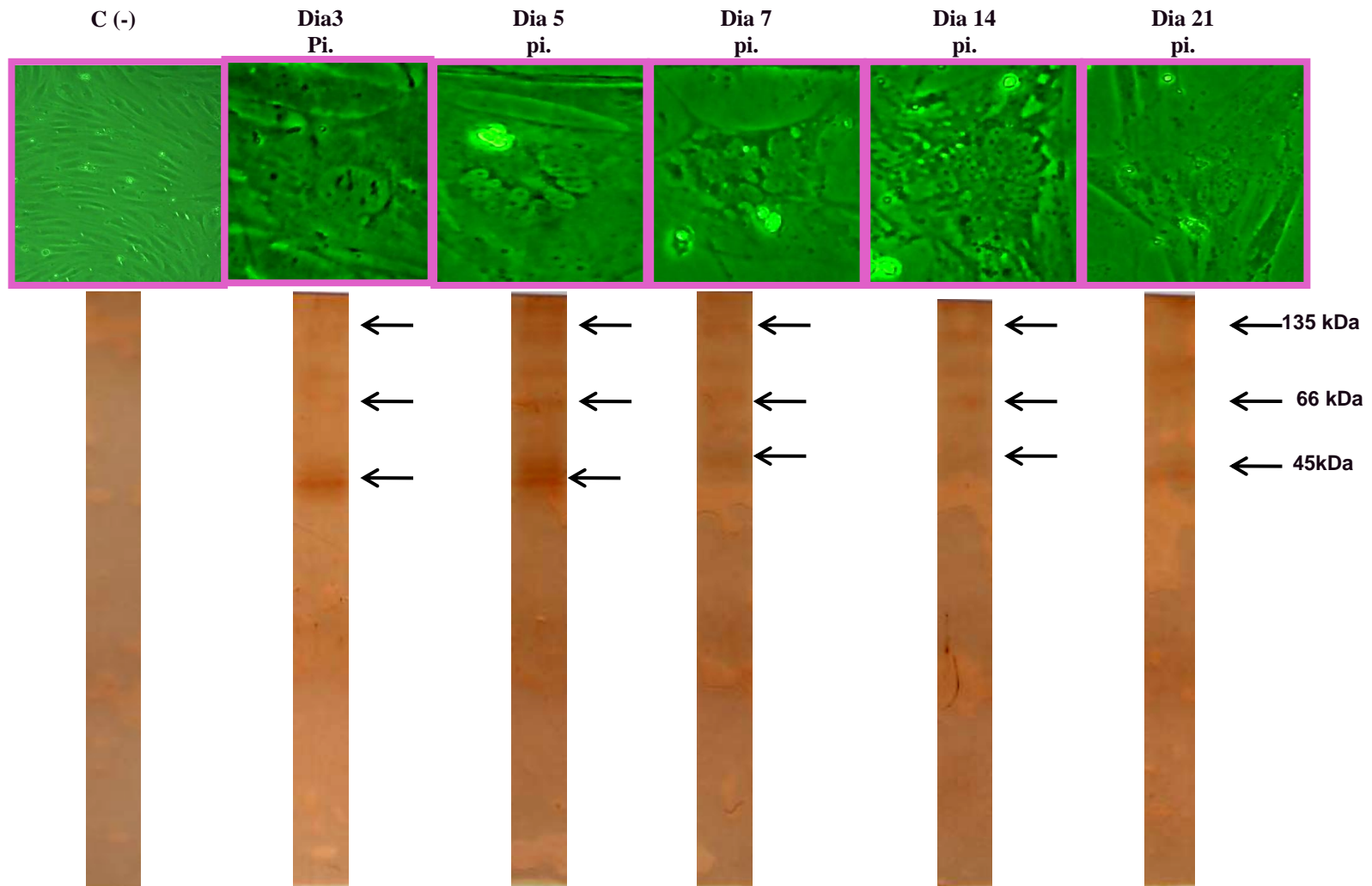




Figura .7 Relación entre la presencia de sincicios y proteínas virales de la Cepa de referencia EV1(de origen ovino) de LvPR.



pi: post-infección

## 7. DISCUSIÓN

Un signo clínico característico en cabras infectadas por LvPR en México es la artritis, la cual se encontró presente en los animales seleccionados para el presente estudio. Es importante mencionar que la artritis en cabras no sólo está relacionada con la infección por LvPR, este signo también es posible encontrarlo en animales infectados por *Clamidia psittacii*., la cual se relaciona con abortos, en infecciones por *Corynebacterium pyogenes* y *Streptococcus pyogenes*, en las que la artritis es de tipo supurativa, infecciones por *Mycoplasma*, *mycoides sub especie mycoides* y *Mycoplasma agalactiae* que causan conjuntivitis y poli artritis aguda e infecciones con *Brucella melitensis* que además causa abortos, orquitis, epididimitis, esterilidad, retención placentaria. Otras causas no infecciosas relacionadas con artritis pueden ser traumatismos y laceraciones. Cabe mencionar que ninguna de las cabras seleccionadas presentó signos compatibles con las patologías antes descritas; adicionalmente estos animales fueron positivos en pruebas serológicas comerciales (IDAG Kit serodiagnostic caev-IDG Caprine Arthritis- Encephalitis Virus. Institut Pourquier- Montpellier- France, que se basa en la detección de anticuerpos contra la p28, ELISA indirecta (Maedi-Visna / C.A.E.V Serodiagnostic Elisa Test Serum. (Institut Pourquier France), basada en la detección de anticuerpos contra p25 y un péptido transmembranal de MVV) las cuales están diseñadas para detectar la infección por LvPR (Piojan, 1986, Trigo, 1991, Mattheus, 1999, Juste *et al*, 2001).

El efecto citopático característico en los cultivos celulares infectados demuestra la replicación de LvPR, con la formación de sincicios (Simard *et al.*, 2001; Torres *et al.*, 2004; Oliveira *et al*, 2008, Glaria *et al.*, 2009, Reina *et al.*, 2009). En el presente trabajo fue posible la observación de células gigantes multinucleadas a los 7 días pos-infección (pi.) a partir de los co-cultivos de células de MSFC con monocitos-macrófagos infectados, igual a lo descrito por Brito y cols. (2007) quienes también encontraron en co-cultivos pero de células de plexo coroideo caprino y con macrófagos obtenidos de cabras infectadas naturalmente, la presencia de células gigantes multinucleadas en el mismo lapso de tiempo. Sin embargo en el presente estudio además se cuantificaron el número de núcleos en las células gigantes.

Por otro lado, se observó una relación entre el número de sincicios y la detección de proteínas virales, ya que a mayor presencia de células gigantes se evidenció una reacción más fuerte en las proteínas virales en el Wb, al infectar células con sobrenadantes de un aislado viral silvestre, reportándose la presencia de efecto citopático hasta 21 días pi; (Ramírez, 2002). En el presente trabajo en el co-cultivo se utilizó polibrene como lo hizo Simard *et al* 2001, no obstante, se describe la observación de células gigantes a los 15 días después de la infección en cultivos de membrana de cornea con la cepa de referencia SK1679 (origen caprino), la posible explicación de esta variabilidad parece estar influenciada por el tipo de célula y el subtipo viral con las cuales fueron infectadas las células (Anderson *et al.*, 1988). Con la cepa WC-L de LvPR se ha encontrado una mayor presencia de sincicios al día 14 post-infección en células derivadas de membrana sinovial de feto, fibroblastos de piel y plexo coroideo de ovinos (Torres *et al.*, 2004; Glaria *et al.*, 2009). Esto último coincide con lo encontrado en el presente estudio.

En una cinética de producción viral realizada por Siamard (2001) y evaluada por Wb se detectaron proteínas 10, 25 y 42 kDa al día 9 y 25 pi. en un aislado viral de origen ovino. Por otro lado Ramírez (2001) describe una cinética de producción viral similar en la cual reconoce un total de 8 proteínas con un rango de peso de 14 a 135 kDa al día 7, 14 y 21 pi.

Las proteínas descritas por Simard son las codificadas por dos genes virales, el gen *gag* (proteína de cápside p25) y gen *env* (proteína de transmembrana gp45), difiriendo en lo encontrado en el presente estudio que fueron dos proteínas codificadas con pesos moleculares aproximados a las proteínas codificadas por el gen *env* (glicoproteína de superficie gp135 y gp45), una del gen *pol* (transcriptasa reversa p66) y otra del gen *gag* (proteína de cápside p28) al día 21 pi para la cepa de origen caprino únicamente.

Esta variabilidad de expresión de proteínas ha sido descrita por Valas *et al.*, 2000, quien describe la diferencia en la expresión de proteínas en un lapso de tiempo (1 a 2 meses). La aparición de variantes de LvPR en los animales (genéticamente y antigénicamente) puede ser una consecuencia de la recombinación genética y afectar la eficacia de detección de las pruebas diagnósticas (Ramírez *et al.*, 2010), en este trabajo sólo se reconocieron 4 proteínas con pesos moleculares similares

a las descritos para los LvPR , una posible explicación por la cual no se reconoció un mayor número de proteínas pudo ser el uso de un anticuerpo primario de origen caprino; en el Wb el cual no pudiera reconocer todas las proteínas de la cepa de origen ovino ya que genéticamente los virus son parecidos pero difieren en algunas proteínas (Valas *et al.*, 2000; Galaria *et al.*, 2009).

La formación de sincicios (usualmente de 5-30 núcleos por célula) se da en un máximo de 5-6 días pi (poco tiempo después de la máxima producción de virus), siendo el resultado de un mínimo nivel de umbral de replicación del virus que ocurre en células vecinas, causando la fusión de membranas celulares. Se ha demostrado que la síntesis de ADN celular no se requiere para establecer la infección de LvPR. Con estas consideraciones en este trabajo se evaluó la relación de la presencia del efecto citopático con la presencia de proteínas virales, obteniéndose una asociación directa de efecto citopático con detección de proteínas virales en la cinética realizada con el virus silvestre ( Figura 6), lo que concuerda con lo descrito por Anderson y Cheevers, 1988.

También en este estudio se realizó una comparación tanto del efecto citopático como de la presencia de proteínas virales durante la cinética de producción viral entre un virus aislado (cepa silvestre) y la cepa de referencia (EV1) encontrando una alta semejanza en los resultados en cuanto al número de núcleos por células gigantes y proteínas virales identificadas durante la cinética (Tabla 5 y figura 6)

Los resultados obtenidos en este trabajo establecen que el tiempo óptimo para la cosecha viral es al día 14, similar a lo descrito por Ramírez, 2002, quien reporta una producción constante con tres picos máximos de producción viral a los días 7, 14 y 21 pi, lo que resulta relevante para la producción de antígenos virales que puedan ser utilizados en diferentes técnicas de diagnóstico para los LvPR.

## 8. CONCLUSIONES

1.-Se aisló y replicó favorablemente una cepa silvestre de LvPR a partir de co-cultivos de monocitos-macrófagos en células de MSFC.

2.-La cinética de producción de proteínas virales de la cepa Silvestre de LvPR determinó que la mayor producción viral fue al día 14 p.i. encontrando proteínas con pesos moleculares de 45, 66 y 135 kDal y una de 28 kDal.

3.-Se encontró una relación entre la presencia de células gigantes multinucleadas y la producción de proteínas virales en ambas cepas.

4.-Se detectaron las proteínas con pesos moleculares aproximados a las proteínas codificadas por el gen *gag* (p28 proteína de capsida) solo en la cepas silvestre y del gen *pol* (p66 transcriptasa inversa) y *env* ( gp45 transmembrana1 y gp135 glicoproteína de superficie) características de los LvPR tanto en la cepa silvestre (caprino) como la EV1 (ovino), por lo que se puede deducir que las proteínas del aislado caprino pueden ser usadas para la detección de LvPR tanto en ovinos como en caprinos con sus respectivas reservas.

.

## 9. BIBLIOGRAFÍA

- 1.-Amorena B, Monleón E, Pacheco C, Pérez M , Monzón M , García E , Rota C. Tendencias actuales en los métodos de diagnóstico de interés epidemiológico. *Med. Vet.* 1997; 14:305-318.
- 2.-Baba SS, Fotabe AI, 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. Rumin. Res.* 2000; 1:37:137-140.
- 3.-Barquero N, Arjona A, Domenech A, Toural C, de las Heras A, Fernández-Garayzabal J , Ruiz-Santa Quiteria JA, Gómez-Lucia E. Diagnostic performance of PCR and ELISA on blood and milk samples and serological survey for small ruminant lentiviruses in central. Spain. *Vet Rec.* 2011; 8:168-20.
4. - Blacklaws B , Bird P , McConnell I . Early events in infection of lymphoid tissue by a lentivirus, maedi-visna .*Trends Microbiol.*1995;3: 11 -23
- 5.-Blacklaws B , Berriarutia E, Tortsteinsdottir S , Watt N , de Andres D, Klein D, Harkiss G. Transmission of small ruminant lentiviruses. *Vet. Microbiol.* .2004; 101:199-208.
- 6.-Brodie SJ , de la Concha-Bermejillo A , Koenig G. Maternal factors associated with prenatal transmission of ovine lentivirus. *J.Infect.Dis.* 1994; 169:653-657.
- 7.-Britt G., Monceyron J , Rimstad E. Natural transmission and comparative analysis of small ruminant lentiviruses in the Norwegian sheep and goat populations. *Vet. Research.*2007; 125:153-161.
- 8.-Campbell GA, Adams LG. The long-term culture of bovine monocyte derived macrophages and their use in the study of intracellular proliferation of *Brucella abortus* *Vet. Immunol. Immunopathol.* 1992; 34: 291-305.

- 9.-Callapiña E, Rivera H. Seroprevalencia de artritis encefalitis viral caprina en el noroeste de la provincia de Yauyos. *Rev. Inv. Vet. Peru* 2002; 131: 87-90
- 10.-Carey N, Dalziel RG. The biology of maedi-visna virus-an overview, *Vet J.* 1993; 149:437-454.
- 11.-Celer VJr, Celer V Detection of antibodies to ovine lentivirus using recombinant capsid and transmembrane proteins. *J Vet Med B.* 2001; 48: 89-95.
- 12.-Cheevers WP, Knowles DP, McGuire TC, Cunningham D, Adams DS, Gorham JR. Chronic disease in goats orally infected with two isolates of caprine arthritis encephalitis lentivirus. *Lab. Invest.* 1988; 58:510–517.
- 13.- Clavijo A, Thorsen J. Application of polymerase chain reaction for the diagnosis of caprine arthritis-encefalitis, *Small Rum Res.*1996;22:69-77
- 14.-Clements J, Zink M. Molecular biology and pathogenesis of animal lentivirus infections. *Clin Microbiol.*1996;9:100- 117.
- 15.- Coll JM, Técnicas de diagnóstico en virología, Editorial Díaz de Santos. España Madrid. 1999:135-160.
- 16.-Crawford TB, Adams DS. Caprine arthritis encephalitis: clinical features and presence of antibody in selected goat populations. *J Am Vet Med Assoc.* 1981; 178:713-719.
- 17.-Craig LE, Nealen ML, Strandberg JD, Zink MC., Differential replication of ovine lentivirus in endothelial cells cultured from different tissues. *Virology.* 1997; 24:316-326.
- 18.-Cruz ET, Hernández GR, Martínez RA, Ramírez AH, Trujillo OMa, Kretschmer, R., Aguilar SA. Detección de anticuerpos contra artritis encefalitis caprina (AEC) mediante inmunoelctrotransferencia *Vet. Méx.* 2002; 34:119-127.

- 19.-Cutlip RC, Jackson TA, Lehmkuhl HD. Lesions of ovine progressive pneumonia: interstitial pneumonitis and encephalitis, *J. Vet. Res.* 1979; 40:1370-1374.
- 20.-D. Andrés D , Klein NJ, Berriatua E. Diagnostic tests for small ruminant lentiviruses, *Vet. Microbiol.* 2005; 10:49–61.
- 21.-Davis J, Clements J.Characterization of a cDNA clone encoding the visna virus transactivating protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*1989; 86:414-418.
- 22.-Dahlberg JE, Gaskin JM , Perk K. Morphological and immunological comparison of caprine arthritis encephalitis and ovine progressive pneumonia viruses. *J. Virol.*1981; 3:914-919.
- 23.-Dawson M . Maedi/Visna a review. *Vet. Rec.* 1980; 106:212-216.
- 24.-De la Concha, A , Magus S, Brodie S, De Matin J. Veneral shedding of ovine lentivirus in infected rams, *Am J. Vet. Res,* 1996;57:684-688.
- 25.-Diario Oficial de la Federación (México) 5 de marzo de 1999.
- 26.-Ding EY , Xiang WH. Immune responses in goats to caprine arthritis-encephalitis virus, *Viral Immunol.*1997; 10:11-115.
- 27.-Dunham SP, Graham E. Retroviral infection of small animals. *Vet Clin Small Anim,* 2008; 38:879-901.
- 28.-Erthouma E, Guiguen F, Chebloune Y, Gauthier D, Lakhil LM., Greenland T, Mornex J , Leroux C. Alogninouwa, Small ruminant lentivirus proviral sequences from wild ibexes in contact with domestic goats. *J. Gen. Virol.* 2008; 89:1478-1484.
- 29.-Gil A , Rola M, Kuźmak J. Application of PCR technique in diagnosis of small ruminant lentivirus infection in sheep and goats. *Pol. J. Vet. Sci.* 2006; 9:213-7.



- 30.-Gjerset B , Rimstad E , Teige J , Soetaert K, Jonassen C. Impact of natural sheep-goat transmission on detection and control of small ruminant lentivirus group C infections. *Vet. Micr.* 2009; 135:2131-238.
- 31.-Glaría I, Reina R, Crespo H , de Andre X, Ramírez H , Biescas E , Pérez MM, Badiola J, Luján L , .Amorena B ,de Andrés D. Phylogenetic analysis of SRLV sequences from an arthritic sheep outbreak demonstrates the introduction of CAEV-like viruses among Spanish sheep. *Vet. Micr.* 2009:156-162.
- 32.- Gorodezky C, Vázquez AA, Pérez VM.F, García SD, Rodríguez UD, Lligüín G, Vega MR. Manual de Procedimientos Serológicos y Celulares de Inmunogenética, Departamento de Inmunología e Inmunogenética del INDRE. Secretaría de Salud, México. 2008:33-40
- 33.-Griffin DE, Narayan O, Adams RJ. Early immune responses in Visna, a slow viral disease of sheep. *J. Infect. Dis.* 1978; 138:340-350.
- 34.-Groner B, Hynes NE. Long terminal repeats provide regulatory signal at the of retroviral genes. *Elsevier*, 1982; 376:400-403.
- 35.-Guiguen F, Mselli-Lanhal L, Durand J , Du J, Favier C, Fornazero C, Grezel D., Balleydier S, Hausmann E, Chebloune Y. Experimental infection of Mouflon-domestic sheep hybrids with caprine arthritis-encephalitis virus, *Am J Vet Res*, 2000;61:456-461.
- 36.- Harmache A, Vitu C, Guiguen F, Russo P , Bertoni G , Pepin M. Priming with tat-deleted caprine arthritis encephalitis virus (CAEV) proviral DNA or live virus protects goats from challenge with pathogenic CAEV, *J Virol* 1998; 72: 6796-6804.
- 37.-Houwens DJ, Gielkens AL, Schaake J. An indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibodies to maedi-visna virus, *Vet. Microbiol.* 1982; 7:209-219.

- 38.-Hermann-Hoesing LMG, Palmer HG, Knowles PD. Evidence of proviral clearance following postpartum transmission of a ovine lentivirus. *Virology* 2007;25:226-234.
39. - Houwers DJ, Pekelder JJ, Akkermans JWPM, Van der Molen EJ, Schreuder BEC. Incidence of indurative lymphocytic mastitis in a flock of infected sheep with Maedi-Visna virus, *Vet Rec.* 1988 ;122: 435-437.
40. – Houwers DJ. Economic importance, epidemiology and control, in: *Maedi Visna and related diseases.* Academic Press, Massachussets. *Small Ruminant Res.* 1995;17:197-198.
- 41.-International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV), Master Species List 2009, <http://talk.ictvonline.org/>
- 42.-Juste RA, De La Concha A. Monografía Maedi Visna Etiología del maedi visna., Editorial Luzan. *Rev.Ovis* 2001; 72:9-23.
- 43.-Kaba J, Rola M, Materniak M, Kuźmak J, Nowicki M. Isolation and characterization of caprine arthritis encephalitis virus in goats from Poland. *Pol J Vet Sci.* 2009; 12 :183188.
44. - Kennedy-Stoskopf S., Narayan O. Neutralizing antibodies to visna lentivirus: mechanisms of action and possible role in virus persistence. *J. Virol.* 1986; 59:37-44
- 45.-Kim FJ , Batin JL, Manel N, Sitbon M. Emerge of vertebrate retrovirus and enveloped capture. *Virology*, 2004; 318:183-191.
- 46.-Klein JR, Martin S, Griffing S, Nathanson N, Gorham RJ, Shen DT, Pétursson G, Georgsson G, Palsson PA, Lutley R. Precipitating antibodies in experimental, Visna and natural progressive pneumonia of sheep. *Res. Vet. Sci.*1985; 38: 129-133.
- 47.-Lamara A L, Mselli-Lakhal D, Tainturiera D. Epithelial cells from goat oviduct are highly permissive for productive infection with caprine arthritis–encephalitis virus (CAEV). *Virus Research*, 2000:87:69-77.

- 48.-Landàzuri N, Gupta M, Le Doux J. Rapid concentration and purification of retrovirus by flocculation with polybrene. *J. Biotechnol.* 2006; 25:529-539.
49. - Legastelois I , Levrey H, Greenland T, Mornex JF, Cordier G. Visna-maedi virus induces interleukin-8 in sheep alveolar macrophages through a tyrosine-kinase signaling pathway. *Resp Cell Mol Biol.* 1998;18: 532-537.
- 50.-Malmsten A, Shao X, Aperia K, Corrigan GE, Sandström E, Källander C Leitner, T, Gronowitz JS.HIV-1 viral load determination based on reverse transcriptase activity recovered from human plasma . *J. Med. Virol.* 2003:347-359.
- 51.- Martinez RHA. Diseminación del virus de artritis y encefalitis caprina (AEC) a partir de machos caprinos infectados experimentalmente y su efecto en el aparato reproductor (tesis doctoral), Cuautitlán Izcalli México. FES-Cuautitlán .Universidad Nacional Autónoma de México 2003.
- 52.- Martínez RHA, Ramírez ÁH, Tortora P, Aguilar Á, Garrido F, Montaraz C. Efecto del virus de la artritis y encefalitis caprina en el aparato reproductor de machos caprinos. *Vet. Mex.* 2005; 36: 159-176
- 53.-Martínez MFO.Evaluación serológica a lentivirus de pequeños rumiantes en una explotación (tesis de licenciatura), Cuautitlán Izcalli México. FES-Cuautitlán. Universidad Nacional Autónoma de México 2009.
- 54.- Mattheus G, Enfermedades de la cabra, Edit. Acribia S.A., Zaragoza España, 1999:87-91.
- 55.-Mochizuki H, Takahashi M, Nishigaki K, Goto-Koshino Y, Watanabe S, Sato H, Sato M, Kotera Y, Fujino Y, Ohno K, Uchida K, Tsujimoto H. Establishment of a novel feline leukemia virus (FeLV)-negative B-cell cell line from a cat with B-cell lymphoma, *Vet Immunol Immunopathol.*2011;15:3-4.

56.-Morin T, Guiguen F, Bouzar B, Villet S, Greenland T, Grezel D, Gounel F, Gallay K, Garnier C, Durand J, Alongninouwa T, Maselli-Lakhal L, Mornex J, Chebloune Y. Clearance of a productive infection in calves experimentally inoculated with caprine arthritis-encephalitis virus. *J Virol.*2003; 77:6430-6437.

57.-Maselli-Lakhal L, Favier C, Leung K, Guiguen F, Grezel D, Miossec P, Mornex JF, Narayan O, Querat G, Chebloune Y. Lack of functional receptors is the only barrier that prevents caprine arthritis-encephalitis virus from infecting human cells. *J Virol.*2000;74:8343-8348.

58.-Modolo RS, de Castro CR, Padovani V, Mendonça Stachissini. Diagnóstico de la Artritis-Encefalitis Caprina por Test de IDGA: Seroconversión de Cabritos Nacidos de Madres Naturalmente Infectadas *J.R. Vet. Zoot.* 2009;2:16-19

59.- Murphy FA, *Veterinary Virology*. Third Edition, Academia Press. United States of America, 1999; 363-369.

60.- Narayan O, Kennedy-Stoskopf S, Sheffer D, Griffin DE, Clements JE. Activation of caprine arthritis-encephalitis virus expression during maturation of monocytes to macrophages, *Infect Immun.*1983;41:67-73.

61. – Nord K, Holstad G, Eik, LO, Gronstol H. Control of caprine arthritis–encephalitis virus infection in three Norwegian goat herds.*Act. Vet. Scand.*1998;39:109–117

62.- OIE Manual sobre animales terrestres 2004.capítulo 2.4.4/5:611-669

63.- Oliveira MA, Andrade PP, Gomez SM. Western blot para o diagnóstico das infecções pelos lentivírus de pequenos ruminantes em caprinos: um método simples para a produção de antígeno A, *Arq. Inst. Biol., São Paulo*, 2008; 75:3:263-270

64.- Oliver RE, Gorham JR, Perryman LE, Spencer GR. Ovine progressive pneumonia: experimental intrathoracic, intracerebral, and intra-articular infections, *J. Vet. Res.*1981;42: 1560-1564.

65.-Ortiz de Lejarazu LR, Cisterna CR, González LA, Maroto MC, Pumarola ST, Viñas RJ. Diagnóstico Microbiológico de la Infección por VIH. Procedimientos en Microbiología Clínica. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica.1998.

66.-Pasic J. Maedi-visna virus and caprine arthritis-encephalitis virus: distinct species or quasispecies and its implication for laboratory diagnosis. Can. J. Vet. Res, 1998; 62:241244

67.- Park JE, Son SY, Shin HJ.Sequence comparison on gag gene of caprine arthritis encephalitis virus from Korea. Virus Genes.2010; 41: 99-101.

68.- Pearson LD, Poss ML, Demartini JC. Animal lentivirus vaccines: problems and prospects. Vet. Immunol. Immunopathol. 1989; 20: 183-212.

69.-Peluso R, Haase A, Stowring L, Edwards M., Ventura PA. Trojan Horse mechanism for the spread of visna virus in monocyte .Virology. 1985; 147:231-236.

70. - Pepin M, Vitu C, Russo P, Mornex JF, Peterhans E. Maedi-visna virus infection in sheep. Vet Res.1998; 29:341-367.

71.- Perdigones M. Seguimiento de la infección por el virus de maedi visna en una explotación de ganado ovino (tesina de licenciatura), Madrid, España, Universidad Complutense, Facultad de Veterinaria 2004.

72.-Pérez SA, Identificación de anticuerpos contra proteínas de lentivirus en machos ovinos por la técnica de inmunoelectrotransferencia (Western blot) y ELISA indirecta (tesis de licenciatura). Cuautitlán Izcalli México. FES-Cuautitlán .Universidad Nacional Autónoma de México 2005.

73.Petterhans E, Greenland T ,Badiola J, Harkiss G, Bertoni G ,Amorena B ,Eliaszewiz M, Juste R, Krassnig R, Lafont J, Lenihan P , Petursson G, Pritchard G, Thorley J, Vitu C , Mornex J, Pepin M. Routes of transmisión and consequences of small ruminat lentiviruses (SRLVs) infection and eradication schemes. Vet. Res. 2006;116:159-167.

74.-Pétursson G, Georrgsson G, Pálsson PA. Maedi-Visna and related disease. In *Virus, Infection of ruminants*.1990;3:23-28 .

75.-Pijoan Aguade Paúl. Principales enfermedades de los ovinos y caprinos, Edit UNAM. 1986:300-307.

76.-Pisoni G, Giuseppe B, Puricelli M, Maccalli M, Moroni P. Demonstration of coinfection with and recombination by caprine arthritis-encephalitis virus and maedi-visna virus in naturally infected goats. *J. Vir.* 2007;81:4948-4955.

77.-Pisoni G, D'Amelio P, Sassi F, Manarolla G, Scaccabarozzi L , Locatelli C, Mazzocchi N, Baruscotti M, Difrancesco D, Moroni P. Multinucleated giant cells with an osteoclast phenotype derived from caprine peripheral blood mononuclear cells. *Vet J.* 2010; 3:367-375

78.- Ramírez, A.H., Evaluación invitro de proteínas antigénicas de virus de artritis encefalitis caprina (AEC) aislado en México, usando la técnica de ELISA y Western Blot (tesis de maestría), Cuautitlán Izcalli México. FES-Cuautitlán .Universidad Nacional Autónoma de México 2002.

79. – Ramírez, A.H., Contribución al diagnostico y a la filogenia de los Lentivirus de Pequeños Rumiantes (tesis doctoral), Pamplona, España, Universidad Publica de Navarra, 2010.

80.-Ramírez H, Glaria I , De Andrés X, Martínez, H , Hernández M, Reina R , Iràizoz E , Crespo H, Berriatua E , Vázquez J, Amorena B , D. Andrés. Recombinant small ruminant small ruminant lentivirus subtype B1 in goats and sheep of imported breeds in Mexico.10.1016.j.tvjl.2010.09005.

81.- Reina R, Mora MI, Glaria I, García I, Solano C, Luján L, Badiola JJ, Contreras A, Berriatua E, Juste R, Mamoun RZ, Rolland M, Amorena B, de Andrés D. Molecular characterization and phylogenetic study of Maedi Visna and Caprine Arthritis Encephalitis viral sequences in sheep and goats from Spain. *Virus Res.* 2006;2: 89-98.

- 82.- Reina R, Grego E, Bertolotti L, De Meneghi D, Rosati S. Genome analysis of small-ruminant lentivirus genotype E: a caprine lentivirus with natural deletions of the dUTPase subunit, vpr-like accessory gene, and 70-base-pair repeat of the U3 region. *J Virol.* 2009; 2:1152-1155.
- 83.-Reina R , Grego E, Profiti M , Glaria I, Robino P, Quasso A, Amorena B, Rosati S. Development of specific diagnostic test for small ruminant lentivirus genotype E, *Vet Microbiol.* 2009 ;18:251-257.
- 84.-Rodríguez VR. Efecto del virus de arthritis encephalitis caprina (AEC) sobre células epiteliales del prepucio caprino in Vitro. (tesis de maestría), Cuautitlán Izcalli México. FES-Cuautitlán .Universidad Nacional Autónoma de México 2008.
- 85.-Rowe JD, East NE. Risk factors for transmission and methods for control of caprine arthritis-encephalitis virus infection. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 1997;13:35-53.
- 86.- Sáenz C. Determinación de la presencia del síndrome de artritis encefalitis caprina en granjas semitecnificadas de los departamentos de Guatemala, Santa Rosa, Sololá y Suchitepéquez” (Tesis licenciatura), Guatemala, Universidad de San Carlos de Guatemala Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia 2006.
- 87.- Saltarelli M, Querat G, Konings DA, Vigne R, Clements JE. Nucleotide sequence and transcriptional analysis of molecular clones of CAEV which generate infectious virus. *Virology* , 1990;179:347-364
- 88.- Saltarelli M, Querat G, Konings DA, Vigne R, Clements JE. Nucleotide sequence and transcriptional analysis of molecular clones of CAEV which generate infectious virus. *Virology.* 1990 ;1:347-364.

- 89.- Sánchez AB , Rodríguez D, Garzón A, Amorena B, Esteban M, Rodríguez JR. Visna Virus / Medi Env proteins expressed by a recombinant vaccinia virus induces cell fusion in cells of different cell origins in the apparent absence of Env cleavage: role of glycosylation and of proteoglycans. Arch. Virol. 2002; 147: 2377-2392.
- 90.-Sharmila C, Williams JW, Reddy PG. Effect of caprine arthritis-encephalitis virus infection on expression of interleukin-16 in goats. J. Vet. Res., 2002; 63:1418-1422.
- 91.- Sihvonen L, Estola T, Tuom IJ .Experimental maedi infection in sheep for detection of Ovine Progressive Pneumonia antibodies using a recombinant transmembrane envelope protein. Diagn. J. Vet. Invest. 1993; 05: 189-193.
- 92.-Saman E, Geertrui VE, Lujan L, Extramiana B, Harkiss G, Tolari F, González L, Amorena B, Watt N, Badiola J. A new sensitive serological assay for detection of lentivirus Infections in small ruminants. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 1999;5:734-740.
- 93.-Shah C, Bòni J, Huder JB, Vodt HR, Mühlher J, Zanoni R, Lutz H, Schûpbach J. Pylogenetic analysis and reclassification of caprine and ovine lentiviruses based on 104 new isolate: evidence for regular sheep-to-goat transmission and word wide propagation through livestock trade. Virol. 2004; 319:12-26.
- 94.- Simard C, Kiberge MT, Singh P , Dixon P. Simple and rapid method for production of whole-virus antigen for serodiagnosis of caprine arthritis-encephalitis virus by enzyme-linked immunosorbent assay. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 2001;8:352-356
- 95.-Sanna E, Sanna MP, Vitali CG, Renzoni G, Sanna L , Spano S , Rossi G, Leoni A. Proviral DNA in the brains of goats infected with caprine arthritis-encephalitis virus. J. Comp. Pathol. 1999; 3:271-600.
- 96.-Thormar,H. ,An Electron Microscope study of Tissue Cultures infected with Visna Virus, Virol. 1961: 14: 463-475.



- 97.-Torres FM, Santos BS. Biological and molecular characterization of an ovine lentivirus isolated in Portugal, *Rev. Port. Cin. Vet.* 2004; 99:24-31
- 98.-Torsteinsdóttir S, Carlsdóttir HM , Svansson V, Matthíasdóttir S, Martin AH, Pétursson G. Vaccination of sheep with Maedi-visna virus gag gene and protein, beneficial or harmful? 2007; 17:6713-6720.
- 99.-Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications, *Proc Natl Acad Sci U S A.*1992; 24:145-149.
- 100.-Tosteinsdottir S , Andersdotti V, Arnarson H , Pettursson G. Immune response to maedi-visna virus. *J.Vet.Res* 2007;12:1532-1547.
101. – Trigo, T. La Artritis –Encefalitis caprina. *Ciencias Veterinarias* 1991;5:50-63
- 102.-Van Maanen C, Brinkhof JM., Moll L , Colenbrander B , Houwers DJ. Aspects of the epidemiology, research, and control of lentiviral infections of small ruminants and their relevance to Dutch sheep and goat farming. *Tijdschr Diergeneeskd.* 2010;15:135:600-603.
- 103.-Valas S, Benoit C, Baudry C, Perrin G, Mamoun, Z. Variability and Immunogenicity of caprine arthritis-encephalitis Virus Surface Glycoprotein, *J. Virol.* 2000; 74: 6178–6185.
- 104.-Watt NJ, Macintyre N, Collie D, Sargan D , Connell M. Phenotypic analysis of lymphocyte populations in the lungs and regional lymphoid tissue of sheep naturally infected with maedi visna virus, *Clin Exp Immunol*, 1992; 90: 204-208.
- 105.- Zapata W, Montoya C, Rugeles M, Factores solubles con actividad inhibitoria contra el Virus de Inmunodeficiencia Humana Tipo 1. *Biomédicas*; 2006; 26:451-466.

106.-Zink M.C., Narayan O, Kennedy PG, Clements JE. Pathogenesis of visna/maedi and caprine arthritis-encephalitis: new leads on the mechanism of restricted virus replication and persistent inflammation. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 1987; 15:167-180

107.- Zink MC, Yager JA , Myers J.D. Pathogenesis of caprine arthritis encephalitis virus. Cellular localization of viral transcripts in tissues of infected goats. *Am. J. Pathol.* 1990; 136:843-854.