



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

**MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA
SALUD ANIMAL**

**“EFECTO DEL VIRUS DE ARTRITIS ENCEFALITIS
CAPRINA (AEC) SOBRE CÉLULAS EPITELIALES
DEL PREPUCIO CAPRINO *IN VITRO*”**

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

P R E S E N T A

RICARDO RODRÍGUEZ VILCHIS

TUTOR PRINCIPAL:

ÁLVARO AGUILAR SETIÉN

COMITÉ TUTORAL:

JORGE L. TÓRTORA PÉREZ

ROGELIO ALONSO MORALES



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.

Dedicatoria

A la Memoria de mi padre

Manuel Rodríguez Morales

Y

De mi suegro

Francisco Palma Huerta

Dedicatorias personales

Gracias a Dios, por guiarnos en cada momento de nuestras vidas, por la vida otorgada y por su paciencia con todos los seres humanos.

A mi esposa Sandra Palma Aclixqueño por ser más que mi compañera en las buenas y las malas.

A mis hijos Erick, Selene y Adrian por ser un motivo para seguirme superando.

A mi Madre Maria Luisa Vilchis Martínez por la vida, el cariño y los valores que me otorgó.

A mis hermanos, hermanas, suegra, cuñados, cuñadas, sobrinos y sobrinas, simplemente.

Gracias

Agradecimientos

A todos los doctores y doctoras que hicieron posible que concluyera mi trabajo y estudios de maestría.

Dr. Humberto Alejandro Martínez Rodríguez

Dr. Álvaro Aguilar Setién

Dr. Jorge L. Tórtora Pérez

Dr. Rogelio Alonso Morales

Dra. Alma Virginia Lara Sagahón

A mi jurado por contribuir en el mejoramiento de la tesis.

Presidente: Dr. Eliseo Hernández Baumgarten

Secretario: Dr. Humberto Ramírez Mendoza

Vocal: Dra. Susana E. Mendoza Elvira

1^{er} Suplente: Dr. Álvaro Aguilar Setién (otra vez)

2^{do} Suplente: Dr. Gilberto Chávez Gris

A la Química Crisceyra Yazmín Vázquez Salinas y a la M en C María Martha García por haberme apoyado en la realización de una parte de este trabajo.

A todas las personas con las que estuve trabajando en el Hospital Centro Médico Siglo XXI y en la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, a mis compañeros y compañeras de clases en la maestría, al personal administrativo de posgrado, a los Dr (a) que me dieron clases y todas aquellas que me faltaron para que no se enojen. GRACIAS.

CONTENIDO

Paginas

Resumen	4
Abstract	5
1. Antecedentes	9
1.1 Introducción	10
1.2 Características generales del virus de AEC	12
1.3 Ciclo viral de los lentivirus	16
1.4 Genes y proteínas del virus de AEC	17
1.4.1 Otras proteínas virales	18
1.4.2 Proteínas de superficie	19
1.4.3 Proteínas nucleares	20
1.4.4 Proteínas no estructurales	20
1.5 Transmisión	20
1.5.1 La transmisión vertical	20
1.5.2 La transmisión horizontal	21
1.6 Signos clínicos	23
1.7 Epitelio de revestimiento	24
1.7.1 Capas epiteliales	24
1.7.2 Prepucio	26
1.7.3 Tipos celulares del epitelio prepucial	26
1.7.4 La tinción de Papanicolaou	27
1.8 Células reservorio del virus	28
1.8.1 Otros tejidos afectados por el virus de AEC	29
1.9 Inmunología	31
1.10 Diagnóstico	33
1.10.1 Inmunodifusión en agar (IDGA)	34
1.10.2 Prueba de Elisa	34
1.10.3 Inmunocitoquímica	34
1.10.4 Cultivo celular	35
1.10.5 Microscopia electrónica	35
1.10.6 Inmunoelctrotransferencia o Western Blot (WB)	35

1.10.7 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	36
1.11 Prevención y control	37
1.12 Programas de erradicación de la enfermedad	38
1.13 Vacunas	38
1.14 Justificación	39
1.15 Hipótesis	39
2. Objetivo general	40
2.1 Objetivos particulares	40
3. Material y métodos	41
3.1 Metodología para la obtención de células a infectar de origen fetal	41
3.2 Metodología para la obtención de células prepuciales de machos adultos seropositivos	41
3.3 Metodología para la obtención de células prepuciales para la técnica de inmunocitoquímica	42
3.4 Metodología para la técnica de PCR	43
4. Resultados	45
4.1 Células de origen fetal	45
4.2 Células de lavado prepuciales	46
4.3 Tipos celulares prepuciales	47
4.4 Técnica de inmunocitoquímica	52
4.5 Análisis de proporción de células marcadas	57
4.6 Técnica de PCR	57
5. Discusión	61
6. Conclusión	69
7. Referencias	70
8. Anexo	89
8.1 Análisis estadístico gráfica 1	89
8.2 Análisis estadístico gráfica 2	89

Índice de figuras

	Paginas
Figura 1.- Mapa genómico del virus de AEC	11
Figura 2.- Ciclo vital de los lentivirus	17
Figura 3.- Tipos de epitelios	25

Figura 4.- Capas epiteliales de la mucosa prepucial	27
Figura 5.- Células de origen fetal	46
Figura 6.- Células epiteliales en cultivos celulares de lavados prepuciales	47
Figura 7.- Diferentes tipos de células prepuciales	49
Figura 8.- Diferentes tipos de células leucocitos	50
Figura 9.- Cultivos de fibroblastos de feto (inmunocitoquímica)	53
Figura 10.- Foto de cultivo celular de fibroblastos de feto ovino negativos	54
Figura 11.- Foto de células epiteliales de lavado prepucial de caprino seronegativo (control testigo)	54
Figura 12.- Fotos de lavados prepuciales observando células epiteliales de caprinos seropositivos al virus de AEC, marcadas por la técnica de inmunocitoquímica	55
Figura 13.- Fotos de lavados prepuciales observando células epiteliales de caprinos seropositivos al virus de AEC, marcadas por la técnica de inmunocitoquímica	56
Figura 14.- Electroforesis en gel de agarosa al 2%, $MgCl_2$ 1.5mM. Amplificados del virus de AEC a partir de ADN y cADN de células epiteliales de un animal seropositivo y del virus	58
Figura 15.- Electroforesis en gel de agarosa al 1.5%, $MgCl_2$ 1.5mM. Amplificados del virus de AEC a partir de DNA de células epiteliales de los animales seropositivos y seronegativos muestreados	59
Figura 16.- Electroforesis en gel de agarosa al 1.5%, 1.5mM $MgCl_2$. Amplificados de HPRT de los animales muestreados	60

Índice de cuadros

Cuadro 1. Principales células blanco de algunos lentivirus	13
Cuadro 2. Proteínas estructurales y funcionales de algunos lentivirus	19
Cuadro 3. Descripción de los epitelios más comunes del cuerpo humano y de los animales	25
Cuadro 4. Células permisivas al virus de AEC <i>in vitro</i>	29
Cuadro 5. Conteo promedio de células epiteliales marcadas	57

Índice de gráficas

Gráfica 1. Proporción promedio de células epiteliales prepuciales en animales seropositivos y seronegativos al virus de AEC	48
Gráfica 2. Proporción promedio de los leucocitos en animales seropositivos y seronegativos al virus de AEC	51

Resumen

La AEC es una enfermedad producida por un retrovirus y su posible transmisión sexual no ha sido definida. La presencia del virus en el semen y en células como las epiteliales abre esta posibilidad. La transmisión venerea dependería de la presencia de células infectadas en el tracto genital de animales pospuberales y de la dosis de virus necesaria para lograr infección por esta vía. Se realizaron lavados prepuciales para la obtención de células epiteliales, con solución de Hank's estéril, en machos caprinos cada 20 días por un periodo de 12 meses. Se utilizaron cinco animales de raza Alpino seropositivos y tres animales de raza Toggenburg seronegativos a la AEC. A las células obtenidas se les realizó la tinción de Papanicolaou para conocer y cuantificar por morfología los tipos celulares presentes. Se realizaron cultivos celulares de prepucios de feto caprinos y ovinos, los cuales se infectaron con el virus de AEC para evaluar la receptividad de este tipo de células. Con técnica de inmunocitoquímica utilizando anticuerpos monoclonales anti-p28 del virus de AEC, sobre las células epiteliales y los cultivos celulares fetales se evaluó la presencia de antígeno viral. Con la técnica de PCR, amplificando un segmento del gen *gag* (297pb) se confirmó la presencia de provirus en las células epiteliales prepuciales. Se detectó Ag viral en las células del prepucio caprino mediante inmunocitoquímica y se obtuvo su amplificación por PCR en cultivos celulares fetales infectados y en dos animales seropositivos. Los resultados confirman que las células epiteliales sirven como reservorios del virus de AEC, sin que se hayan podido detectar cambios patológicos aparentes en su morfología.

Palabras claves: células epiteliales, inmunocitoquímica, prepucio, PCR, lentivirus.

Abstract

Caprine arthritis encephalitis (CAE) is a viral infection of goats caused by a retrovirus (lentivirus) and its possible sexual transmission has not been defined. The presences of virus in semen and epithelial cells generate new scenario, where transmission would depend on the presence of infected cells in the genital tract of postpuberal animals and infective virus titre. Preputial lavages of male goats were carried out with sterile Hanks solution to obtain epithelial cells, every 20 days for a period of 12 months. Experimental animals included five Alpine CAE seropositive, and three Toggenburg CAE seronegative goats. Papanicolaou smears were done with cells obtained from preputial lavages; cells were quantified and cell morphology types assessed. Pathological changes in their morphology were not observed. Goats and sheep fetal preputial cell cultures were established and later infected with the CAE virus to evaluate cell type susceptibility to infection. Detection of viral antigen in the cell cultures was evaluated by immunocytochemistry using monoclonal antibodies anti-CAEV p28 on the epithelial cells smears from the preputial lavages and fetal cell cultures. Viral infection was confirmed by a Polymerase Chain Reaction (PCR), with a positive amplification of the gag gene segment (297pb) which proved the provirus was present in both; epithelial preputial cells from the lavages and the infected cell cultures. Viral antigen was detected in preputial cells of CAE seropositive goats by immunocytochemistry and positive gag gene segment (297pb) PCR were obtained from two CAE seropositive goats, as well from infected fetal cell cultures. The results confirm that epithelial cells can served as reservoirs of CAEV, without any pathological changes in their morphology.

Key Words: preputial epithelial cells, immunocytochemistry, PCR, retrovirus.

1. Antecedentes

Históricamente, los primeros lentivirus fueron cultivados a partir de muestras de borregos islandeses con la enfermedad de maedi-visna (Sigurdsson, 1954). Replicaron el virus en monocapas de fibroblastos, derivados del plexo coroideo de borregos, pues el virus invariablemente provocaba inflamación en ese tejido en los animales enfermos.

Otro lentivirus, el de la artritis encefalitis caprina (AEC) fue después aislado de cabras con sinovitis/artritis y parálisis en los Estados Unidos (Crawford *et al.*, 1980; Narayan *et al.*, 1980), el signo característico de cabras infectadas con este virus es la artritis, se utilizaron células derivadas de la membrana sinovial de cabras, células tipo fibroblastos y epiteliales para la propagación del virus (Crawford *et al.*, 1980; Narayan *et al.*, 1980).

La AEC es una enfermedad también conocida como rodilla grande, leucoencefalomielitis-artritis de las cabras, leucoencefalomielitis viral, infección por retrovirus caprino o artritis encefalitis caprina viral. Esta enfermedad fue reconocida en los Estados Unidos por Cork *et al.*, 1974, quienes describieron un síndrome de encefalomielitis en cabritos de 2-4 meses de edad y no fue sino hasta 1979 cuando se aisló el virus de los mismos rebaños con artritis y encefalomielitis denominándose virus de la artritis encefalitis caprina (Adams y Crawford, 1980; Crawford *et al.*, 1980). La enfermedad repercute económicamente en los rebaños por su presentación clínica, con reducción de la vida útil de los animales, disminución de la producción de leche y en la venta de reproductores (Peretz *et al.*, 1993). La AEC es una enfermedad de distribución mundial, que afecta principalmente a cabras productoras de leche en los países industrializados, Francia, Estados Unidos, Canadá y Australia entre otros, con prevalencias de un 65% a 81% (Adams, 1984; Crawford y Adams, 1981; East *et al.*, 1987) otros países, como Noruega, tienen un 42%, mientras que países como Kenia y México presentan prevalencias de un 4-5%, en animales de producción semi-intensiva (Adams *et al.*, 1984; Baba *et al.*, 2000; Nord *et al.*, 1998).

La AEC se diagnosticó por su cuadro clínico y por serología en México en 1983 (Nazara *et al.*, 1983a; Nazara *et al.*, 1985b) y la caracterización de la enfermedad fue hecha por los mismos autores (Nazara *et al.*, 1985c). Los estudios serológicos mediante la técnica de inmunodifusión doble que realizó Nazara en 1985 demostraron una seroprevalencia de AEC de entre 17% y 35% en cabras importadas, en tanto que en cabras autóctonas la serología fue negativa, estos estudios se realizaron en la zona norte, centro y sur de México (Nazara *et al.*,

1985). En 1986 se reportó el primer aislamiento del virus en México (Gay *et al.*, 1986). Posteriormente se identificó la presencia del virus de AEC, por medio de estudios serológicos, histopatológicos, inmunocitoquímicos y ultraestructurales (Leyva *et al.*, 1988) y recientemente su aislamiento en células de membrana sinovial y su identificación por medio de la prueba de reacción en cadena de la polimerasa (Daltabuit *et al.*, 1999).

Actualmente la AEC se encuentra enlistada en el Grupo 3 de enfermedades y plagas exóticas y enzooticas de notificación obligatoria en los Estados Unidos Mexicanos (Diario Oficial de la federación, México 2008).

1.1 Introducción

La artritis encefalitis caprina (AEC) es una enfermedad viral de las cabras domésticas (Cheevers *et al.*, 1981; Crawford *et al.*, 1981) que se caracteriza por causar artritis crónica progresiva, mastitis indurativa y neumonía intersticial en animales adultos y leucoencefalomielitis en animales jóvenes (Lechner *et al.*, 1996; Mdurvwa *et al.*, 1994).

El virus causal tiene un diámetro de 80 a 130 nanómetros (nm), envuelto, con genoma diploide y contiene un dímero invertido de moléculas lineales de ARN de sentido positivo (Putney y Montelaro, 1990). No es oncogénico (Crawford *et al.*, 1980 a, b), es magnesio dependiente (Mg^{2+}) (Knowles, 1997; Pugh, 2002). La cadena de ARN tiene un extremo 5'cap operculado y un 3'poliadenilado final. (Anderson y Cheevers, 1981; Crawford *et al.*, 1980; Dahlberg *et al.*, 1981; Dawson M, 1988).

El genoma se encuentra en el interior de la nucleocápside (NC), la cual incluye cerca de 30 moléculas de transcriptasa reversa (RT), con simetría helicoidal, la cual transcribe una copia de ADN (cADN) a partir del ARN viral y solo así el virus es funcional. La cADN es integrada al ADN de las células infectadas por acción de la Integrasa (Narayan *et al.*, 1983).

La cápside del virus (CA) es de morfología icosaédrica, de cerca de 60 nm de diámetro, rodeada por una capa de proteína de matriz (MA) y el virión presenta una envoltura externa (SU) compuesta por una bicapa de lípidos que contiene la proteína transmembranal (TM), la envoltura la obtiene el virus de la membrana plasmática de la célula hospedera, de la cual se proyectan peplómeros de glicoproteínas. Los lentivirus presentan 72 protuberancias (peplómeros) cada una con 10 nm de longitud, con una protuberancia distal ovoide (Clavijo y Thorsen, 1996; Murphy *et al.*, 1999; Pétursson *et al.*, 1992).

El genoma del vAEC tiene 9189 pares de bases y además contiene tres genes estructurales principales (figura 1), cada uno de los cuales codifica dos o más proteínas: el gen *gag* (antígeno específico de grupo) de un tamaño de 1343 bases; el gen *pol* (polimerasa) de un tamaño de 3314 bases y el gen *env* (envoltura) de un tamaño de 2597 bases (Gen bank, 1993; Pepin *et al*, 1998; Pétursson *et al.*, 1992; Saltarelli *et al.*, 1990).

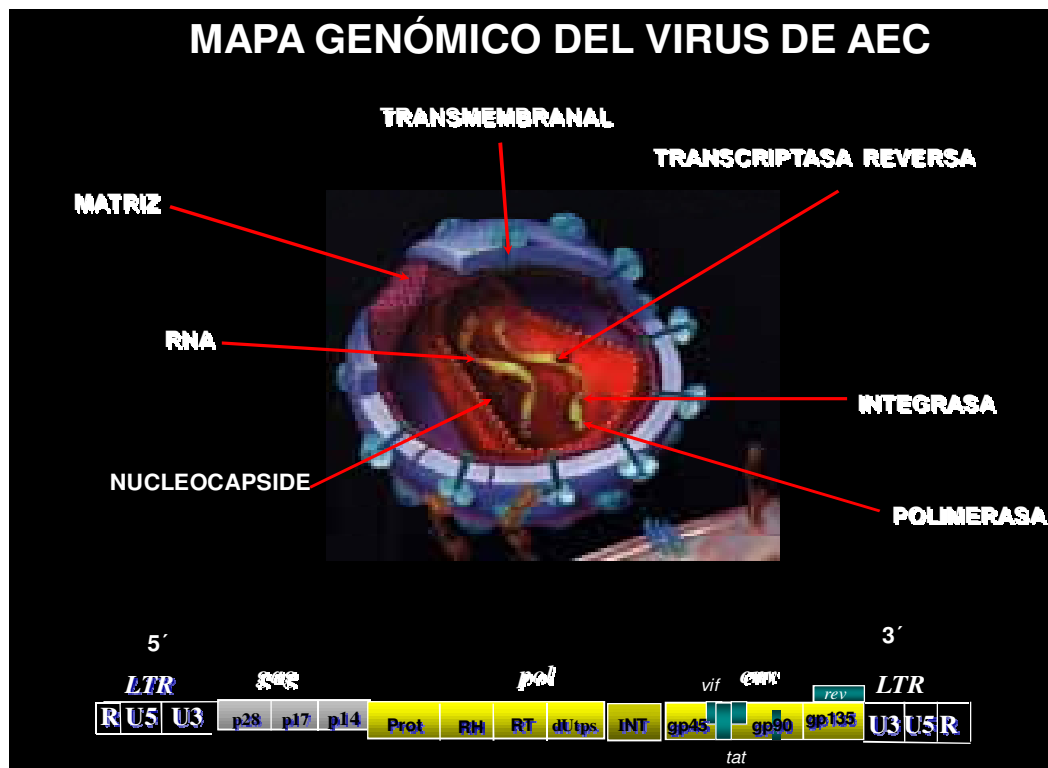


Figura 1. Mapa genómico del virus de artritis encefalitis caprina (modificado de el origen del VIH - SIDA.htm).

El virus de maedi-visna y el virus de la AEC son lentivirus que han sido modelos para el estudio del VIH, ampliamente estudiado y molecularmente clonado y son muy parecidos antigénicamente, además tienen una extensa relación en las regiones *gag* y *pol* de sus genomas (Pyper *et al.*, 1986).

La comparación en la secuencia de aminoácidos del virus de AEC y maedi-visna demostraron de 74.5 a 77.5 % de relación en los genes *gag* y *pol*, pero solamente 60 a 63 % en el gen *env* (Saltarelli *et al.*, 1990).

1.2 Características generales del virus de AEC

El virus pertenece a la Familia: Retroviridae, Subfamilia: Orthoretrovirinae, Género: Lentivirus, Subgénero: Lentivirus de los pequeños rumiantes (Murphy *et al.*, 1999; ICTV, 2005).

Los lentivirus se componen aproximadamente de 60% de proteína, 35% de lípidos, 3% de carbohidratos y 1% de ARN (Pétursson *et al.*, 1992).

La alta heterogeneidad en la secuencia de nucleótidos y aminoácidos en los lentivirus, pueden determinar su antigenicidad, virulencia y multiplicación en distintas condiciones, afectando su persistencia y escape del sistema inmune. A pesar de los diferentes órganos blanco donde se encuentran estos virus, su tropismo celular y patogenicidad, el virus de AEC y el virus de maedi-visna fueron recientemente asignados a un grupo: Lentivirus de los pequeños rumiantes (LPRs). Los lentivirus presentan diferencias en el desarrollo de la enfermedad, por lo que se dividen en dos grupos: el primero comprende al virus de la inmunodeficiencia humana (vIH), al virus de la inmunodeficiencia del simio (vIS) y al virus de la inmunodeficiencia felina (vIF), los cuales se replican en linfocitos y macrófagos y causan el síndrome de inmunodeficiencia adquirida y una enfermedad órgano específica de los pulmones, sistema nervioso central (SNC) y tracto gastroentérico. El segundo grupo comprende al virus de la anemia infecciosa equina (vAIE), al virus de la artritis encefalitis caprina (vAEC) y al virus de maedi-visna (vMV) que sólo se replican en macrófagos, no afectan linfocitos y causan una enfermedad órgano específica del sistema nervioso central, pulmón y articulaciones (Bruett *et al.*, 2000) (cuadro 1).

También pueden ser subdivididos genéticamente dentro de los grupos A-D con subgrupos presentes en los grupos A y B de acuerdo a la más reciente clasificación de subtipos genéticos (Shah *et al.*, 2004a), empezada en la última década (Zanoni, 1998), los prototipos de borrego como SA-OMVV, KV1514 y EV1, fueron asignados al grupo A1, que contiene solamente LPRs de borregos (Shah *et al.*, 2004a).

Los prototipos de LPRs de cabras son el vAEC-Co y el vAEC IGA, pertenecen al grupo B (B1) y C respectivamente, ambos contienen secuencias del LPRs solamente de cabras. Los grupos A2 y D solamente contienen secuencias del LPRs de borregos y los grupos A5 y A7 solamente contienen secuencias del LPRs de cabras. Los grupos A3, A1, A6 y B2 contienen secuencias del LPRs de cabras y borregos (Shah *et al.*, 2004a).

Cuadro 1. Principales células blanco de algunos lentivirus

ENFERMEDAD	ESPECIE NATURALMENTE INFECTADA	PRINCIPAL CÉLULA BLANCO	MANIFESTACIÓN CLINICA
Artritis encefalitis caprina	Caprinos	Monocito/macrófago, células dendríticas	Artritis, neumonía, mastitis, encephalitis (Gendelman, 1985)
Maedi-Visna	Ovinos	Monocito/macrófago, células dendríticas	Neumonía, encefalitis, mastitis y artritis (De la Concha-Bermejillo, 1996)
Inmunodeficiencia humana	Humanos	Monocito/macrófago Linfocito CD4 ⁺	Deficiencia inmune (Van-Voorhis, 1991)
Inmunodeficiencia felina	Gatos	Monocito/macrófago Linfocitos CD4 ⁺ y CD8 ⁺ , B	Deficiencia inmune, tumores (Jordan, 1999)
Anemia infecciosa equina	Equinos	Monocito/macrófago, células dendríticas	Fiebre, anemia, animales asintomáticos (Kono, 1973)
Inmunodeficiencia del simio	Monos	Monocito/macrófago Linfocito	Deficiencia inmune (Miller, 1994)
Inmunodeficiencia bovina	Bovinos	Monocito/macrófago Linfocitos T, B γ δ	Infección subclínica, Deficiencia inmune, tumores (Nash, 1995)

Fuente: Modificada de Pepin *et al.*, 1998.

En el año de 1984 se clasificó a los LPRs con base en sus propiedades estructurales, genéticas y de replicación en dos tipos:

El tipo 1 o virus con composición de proteínas similares al vMV, tienden a ser altamente citopáticos, causando lisis en cultivos celulares, altamente patógenos *in vivo* y además inducen la producción de anticuerpos neutralizantes.

El tipo 2 o virus con composición de proteínas similares al vAEC, no producen citolisis, ocasionan infecciones persistentes en cultivos celulares, tienen baja patogenicidad en animales infectados y no inducen la formación de anticuerpos neutralizantes (Querat *et al.*, 1984).

El virus de la AEC *in vitro* tiene predilección por células de membrana sinovial (MS). La formación de células multinucleadas (5-30 núcleos por célula) o sincitios se observa en un máximo de 5-6 días post-infección (poco tiempo después de la máxima producción de virus), aunque cultivos obtenidos por explante también pueden soportar la replicación del virus, como en el caso de cerebro, plexo coroideo, pulmón y riñón de cabra, pero con una reducida eficiencia comparados con las células de membrana sinovial (Anderson y Cheevers, 1981; Ellis *et al.*, 1988).

En algunos casos las células infectadas pueden continuar dividiéndose mientras geman un gran número de viriones. La mayor concentración de antígeno viral y ARN viral se encuentra en células multinucleadas de cultivos de membrana sinovial (71%) (Anderson y Cheevers, 1981; Pétursson *et al.*, 1992).

A diferencia de la alta producción viral en células permisivas en el cultivo *in vitro*, la replicación de los lentivirus en los tejidos de los animales *in vivo* es altamente focal y no productiva. Se encuentran pocas células que contengan ADN viral y muchas de éstas producen poco o nada de ARN viral y por consecuencia producen menos antígeno viral detectable. Esta restricción parece depender del estado fisiológico y del desarrollo de las células. Se ha visto en las células blanco monocito/macrófago, que cuando los monocitos infectados tienen una baja producción de virus, se diferencian en macrófagos. En las células hospederas se aumenta la replicación celular, permitiendo incrementar la producción viral (Guiguen *et al.*, 1990).

En animales infectados de forma subclínica, la replicación del virus en células blanco es restringida a niveles mínimos de expresión en todos los tejidos y relativamente pocas células son infectadas. En contraste, en animales enfermos de forma clínica, la infección brota violentamente con una elevada producción de virus en los macrófagos locales, de los tejidos afectados (Narayan *et al.*, 1977; Pétursson *et al.*, 1976).

El desarrollo de la enfermedad clínica tarda de unos meses a pocos años, con infección de muchos animales en forma subclínica (Crawford y Adams, 1981; Phels y Smith, 1983), por lo que no todos los animales presentan cuadro clínico (Narayan y Clements, 1989; Narayan *et al.*, 1992).

El virus de la AEC es adherido en células monocito/macrófago en el intestino, dentro de éstas células, el virus reside en forma de provirus en el ADN nuclear (Werling *et al.*, 1994; Zink *et al.*, 1987).

Se ha demostrado que el ARN viral es capaz de pasar directamente de una célula infectada a una célula no infectada, previo a la producción de partículas maduras del virus (Zink y Narayan, 1989).

Los lentivirus infectan a los macrófagos y las células dendríticas (Desrosiers, 2001). Además, algunos de ellos como el virus de la inmunodeficiencia humana y del simio (vIH y vIS) infectan a los linfocitos CD4, creando una importante inmunodeficiencia, mientras que otros, como el de la inmunodeficiencia felina (vIF), infectan a los linfocitos B y CD8. En los pequeños rumiantes, la serie monocito/macrófago es considerada la diana del virus (Gendelman *et al.*, 1985), pero otras células, como las epiteliales pueden ser también infectadas. La replicación de los lentivirus de pequeños rumiantes en órganos y tejidos no linfoides es específica de tejido y dependiente de la maduración y la activación del macrófago (Brodie *et al.*, 1985; Gendelman *et al.*, 1985).

La replicación del virus y la expresión de las proteínas virales en dichos tejidos y órganos, son típicamente detectables en macrófagos activos. Así en los monocitos infectados no hay replicación del virus (Narayan *et al.*, 1982,1983). Los monocitos pueden actuar como "Caballos de Troya", que permiten el acceso del virus, en células portadoras del mismo, a los tejidos en los que maduran y se convierten en macrófagos activos, estimulándose en ellos la replicación viral (Narayan *et al.*, 1982,1983; Peluso *et al.*, 1985).

Los primeros estadios de la infección por LPRs, según se ha descrito, implican el paso del virus o de células portadoras de virus, a través de la barrera epitelial. Lo que puede conducir a una infección directa de las células dendríticas en el epitelio o en las capas subyacentes y su migración a través de la linfa aferente a los nódulos más próximos (Ryan *et al.*, 2000), en los que se hallan los distintos componentes del sistema inmune. En dichos nódulos tiene lugar la replicación viral, con inducción de la respuesta inmune y aparición de una adenopatía linfoide (inflamación del nódulo). Curiosamente, la depleción *in vivo* de células T-CD4, pero no de las CD8, produce una reducción de la presencia del virus en el nódulo linfático y la linfa eferente, aunque no se sabe la vía por la que estos linfocitos, estando libres de virus, ejercen dicho efecto (Eriksson *et al.*, 1999). La diseminación del virus y de las células infectadas al tejido linfoide y otros tejidos, ocurre a través del sistema linfático eferente y el conducto torácico, a partir del cual las células se introducen en el torrente sanguíneo (Cohen y Fauci, 2001) y llegan a los órganos linfoides y otros tejidos que actúan como reservorio, pudiendo en estos últimos desarrollarse la lesión.

Muchas cabras infectadas desarrollan anticuerpos específicos, los cuales persisten de por vida (Adams *et al.*, 1980; Crawford *et al.*, 1980) y la detección de anticuerpos puede ser tomada como prueba de la presencia de infección viral (Adams *et al.*, 1983; Narayan y Cork, 1990). Además menos del 10 % de las cabras infectadas desarrollan la enfermedad clínica caracterizada por la artritis persistente crónica, mastitis, problemas respiratorios y encefalitis (Crawford *et al.*, 1980; Narayan y Cork, 1990; Zink, 1990).

El tiempo entre el momento de la infección y el desarrollo de niveles detectables de anticuerpos y la aparición de la enfermedad clínica puede variar de meses a años (Adams *et al.*, 1980; Rimstad *et al.*, 1993).

El virus de AEC causa una infección de por vida y la enfermedad puede afectar múltiples órganos resultando en incapacidad de movimiento de las articulaciones o hasta la muerte de los animales, a pesar de la respuesta inmune humoral y celular que se establece (Narayan y Clements, 1989).

La enfermedad se caracteriza por inducir infecciones persistentes y con largos periodos de latencia (Zink *et al.*, 1990), apareciendo los signos después de la seropositividad a la enfermedad (Narayan y Clements 1989).

Como no hay tratamientos efectivos los animales infectados permanecen como reservorios del virus durante toda su vida (Dawson, 1988).

Esta enfermedad es importante por su impacto económico, causa pérdidas del 25 % ó más en la productividad del rebaño (Keenan *et al.*, 1999). Las pérdidas se pueden traducir en mortalidad de animales jóvenes, pérdida de peso, disminución en la producción de leche, además de la obligariedad del sacrificio de los animales seropositivos en países con programas de control (Smith y Cutlip, 1988).

1.3 Ciclo viral de los lentivirus

Los lentivirus poseen dos copias idénticas de un genoma ARN monocatenario positivo y una envoltura externa que contiene proyecciones de glicoproteínas virales. Cuando las glicoproteínas de la envoltura interactúan con una proteína o un grupo de proteínas de la membrana específicas de la célula susceptible, la envoltura del lentivirus se fusiona directamente con la membrana plasmática, sin antes ser sometida a endocitosis. Después de la fusión, la nucleocápside ingresa al citoplasma de la célula; trifosfatos de desoxinucleótidos del citosol penetran en ella y la transcriptasa reversa y otras proteínas virales polimerizan a los trifosfatos y copian el genoma del ARN monocatenario del virus para producir una copia de

ADN bicatenaria, la transcriptasa reversa solo puede agregar nucleótidos al extremo 3' del iniciador (Primer) apareado por sus bases a la plantilla. Esta función la cumple un oligo-dT libre agregado al hibridizar la cola poli (A) 3' de cada plantilla de ARNm. La copia de ADN viral es transportada hacia el interior del núcleo por la integrasa, la cual la incorpora en alguno de los muchos sitios posibles del ADN cromosómico de la célula infectada. El ADN viral ya integrado, denominado provirus, es transcrito por la RNA polimerasa de la célula, tras lo cual genera ARN mensajeros virales y moléculas de ARN genómico. Se traducen los ARNm virales a glicoproteínas y proteínas de la nucleocápside, estas se ensamblan con el ARN genómico para formar las nucleocápsides de la progenie, las cuales interactúan con las glicoproteínas virales unidas a la membrana, para después formar con la membrana de la célula infectada brotes que se liberan por gemación, constituyendo los virus de progenie (Coffin, 1996; Lodish, 2002) (figura 2).

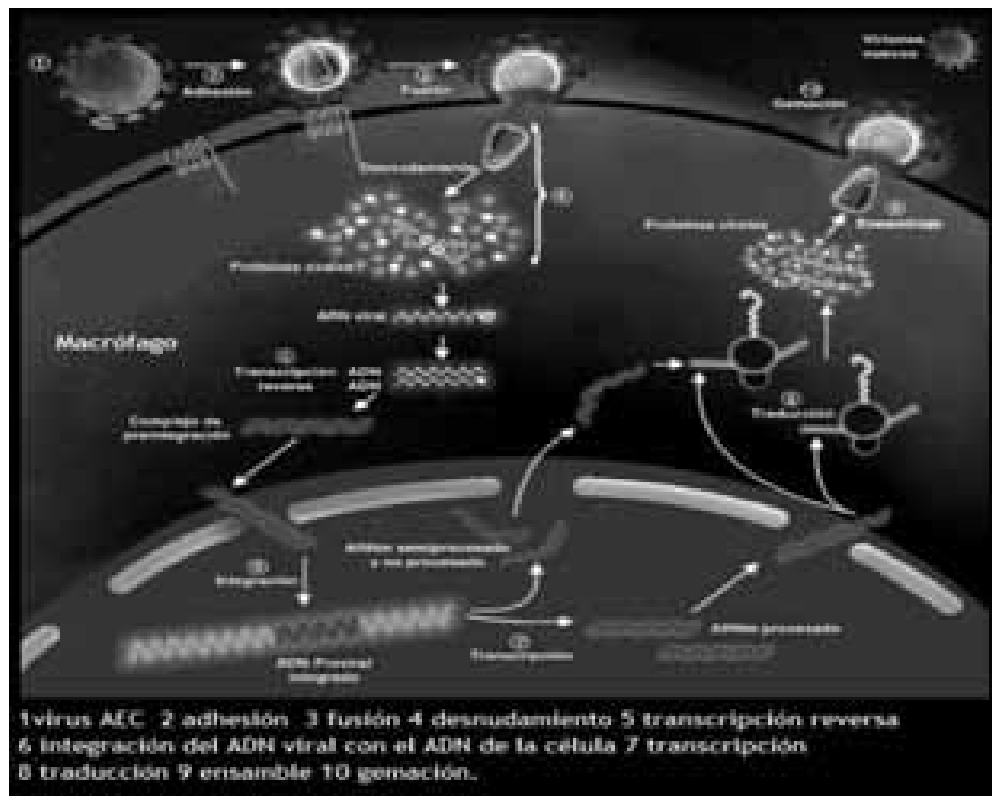


Figura 2. Ciclo viral de los lentivirus. (Fuente: modificado de Biomédica - BSoluble factors with inhibitory activity against type 1.htm).

1.4 Genes y proteínas del virus de AEC

El gen *gag*, codifica para 3 proteínas internas de los lentivirus, incluida la matriz (MA) (p17), que está por debajo de la bicapa de lípidos, la proteína mayor de la

cápside (CA) (p25) y la ribonucleoproteína básica (NC) (p14), asociada al ARN genómico. Cada partícula viral contiene 1000 copias de cada proteína del *gag* (Parekh *et al.*, 1980).

El gen *pol*, codifica para las enzimas virales, la transcriptasa reversa (TR) de la cual 5-10 copias están asociadas con el ARN viral en cada virión, la integrasa (IN) que facilita la integración del provirus en el genoma de la célula infectada, la proteasa (PR) que es esencial para la infectividad y maduración del virus de AEC y el virus de MV, la dUTPasa, necesaria para la infección en macrófagos (Murphy *et al.*, 1999; Pepin *et al.*, 1998; Tesoro, 2001).

El gen *env*, codifica para las proteínas de envoltura o superficie de los virus, incluidas las glicoproteínas glicosiladas de superficie (SU) y la infrecuente proteína transmembranal hidrofóbica (TM). De estas proteínas hay 100 copias por partícula viral, quizá arraigadas en un modelo simétrico en la bicapa de lípidos, como trímeros de las glicoproteínas (SU) y (TM) (Ozel *et al.*, 1988).

Los lentivirus de los pequeños rumiantes presentan 3 genes accesorios:

El gen *vif* (Factor de infectividad viral), induce una débil respuesta inmune *in vivo*, se requiere para una eficiente replicación y patogenicidad del virus *in vivo* (Harmache *et al.*, 1995, 1996; Petursson *et al.*, 1992; Saltarelli *et al.*, 1990).

El gen *tat* previene la terminación prematura de la transcripción incrementando la expresión génica viral *in vivo* (Jackson *et al.*, 1991; Pétursson *et al.*, 1992; Saltarelli *et al.*, 1990).

El gen *rev* (Regulador de la expresión de proteínas del virión) (Harmache *et al.*, 1995). Codifica una proteína que esta involucrada en los empalmes de los transcritos de ARN viral. Este gen es bipartito y se localiza en una pequeña región de la extremidad 5' del gen *env* y una región más grande en la región 3' del mismo gen (Coffin, 1996; Pétursson *et al.*, 1992; Saltarelli *et al.*, 1990).

1.4.1 Otras proteínas virales

La proteína mayor p28 de la cápside, es considerada como uno de los antígenos inmunodominantes en la infección por lentivirus (Houwens y Nauta, 1989). Este es el primer antígeno reconocido por el sistema inmune de los animales infectados y la producción de anticuerpos específicos a p28 persisten por largo tiempo. La reactividad a la proteína p28 fue encontrada en todos los sueros examinados de animales infectados, en contraparte la reactividad a la proteína de matriz p18, fue

evidente solamente en sueros positivos con altos títulos de anticuerpos (Turín *et al.*, 2005).

Antigénicamente los epítomos de la proteína p28 habían sido caracterizados en las proteínas transmembranales (Bertoni *et al.*, 1994), pero la información obtenida por reacción cruzada de epítomos en la cápside antigénica, indican que p28 está presente en la cápside del virus de AEC (Kwang *et al.*, 1995).

Recientemente se reportó la detección de la proteína p28 del virus de AEC en cotiledones de cabras alpinas (Buendía *et al.*, 2005).

Cuadro 2. Proteínas estructurales y funcionales de algunos lentivirus.

Virus	SU	TM	MA	CA	NC	TR	PR
vAEC	gp 135		p 19	p 28	p 16		
VISNA	gp 135		p 16	p 27	p14		
vIH-1	gp 120	gp41	p 17	p 24	p 7	p 66	p 12

Adaptado del Leis *et al.*, (1988). Proteína de superficie (SU), Proteína transmembranal (TM), Proteína de matriz (MA), Proteína de cápside (CA), Proteína de nucleocápside (NC), transcriptasa reversa (TR), Proteasa (PR).

Numerosos estudios indican que las proteínas estructurales y las no estructurales de los lentivirus son inmunogénicas durante las infecciones persistentes (cuadro2).

1.4.2 Proteínas de superficie

Las glicoproteínas SU y TM de superficie “protuberancia o punta” son proyecciones localizadas en la superficie, sobre la envoltura viral. Estas proteínas son el blanco de la respuesta inmune del hospedador y median un número importante de funciones biológicas incluido el ensamble a receptores y fusión de membranas.

La gp 135 del virus de AEC demostró que confiere resistencia a las proteasas del hospedador, protege al virus de la acción de los anticuerpos neutralizantes y determina la infectividad viral y su virulencia en vivo (Huso *et al.*, 1988).

1.4.3 Proteínas nucleares

MA, CA y NC son estructuradas en el citoplasma celular donde son procesadas por una proteasa viral (PR) durante el ensamble. La proteína de matriz se localiza inmediatamente debajo de la envoltura de la bicapa de lípidos, esta proteína pesa de 15-17 KiloDalton (KDa).

La proteína de cápside, es la más abundante en los virus y es el mayor componente en el núcleo viral. Estas proteínas tienen un peso de 24-48 KDa y pueden ser modificadas por fosforilación (Putney y Montelaro, 1990).

Proteínas de la nucleocápside, estas proteínas varían en su masa molecular de 7 a 11 KDa, son ricas en lisina y arginina y contienen un compuesto de cisteína–histidina, estas estructuras se asocian a varios ácidos nucleicos, y quizá sean esenciales en la transcripción reversa y el ensamble (Meric y Goff, 1989).

1.4.4 Proteínas no estructurales

La regulación de estas proteínas se da en el citoplasma y núcleo de las células infectadas (Peterlin y Luciw, 1988), incluyen los genes *tat*, *vif*, *nef*, *rev*. Las proteínas no estructurales son relativamente pequeñas 6 a 20 KDa, escasas y frecuentemente ligadas al ácido nucleico, todas las proteínas no estructurales parecen ser inmunogénicas en individuos infectados con VIH.

1.5 Transmisión

Poco después de la infección de una célula, el virus entra en un modo latente o restringido de replicación (Haase, 1986) y la cantidad de virus en sangre y secreciones, tiende a ser muy baja. En sangre, alrededor de 1×10^6 células blancas sanguíneas están infectadas. Sin embargo a pesar del pequeño número de virus, la transmisión no solamente ocurre entre madre y prole, sino también entre animales adultos (Blacklaws *et al.*, 2004).

1.5.1 La transmisión vertical

La transmisión vertical es la de mayor importancia y ocurre de la madre a su cría (cabrito) por el consumo de calostro y leche infectada, la práctica de mezclar la leche de varias madres, puede facilitar la diseminación de la enfermedad en la población de cabritos (Pétursson *et al.*, 1992; Rowe y East, 1997).

En útero la transmisión vertical probablemente no ocurra u ocurra en niveles muy bajos (Reddy *et al.*, 1993; Kwang *et al.*, 1995). También esta ruta es considerada

controversial. Algunos autores proveen evidencia a favor de esta ruta de transmisión, mientras otros autores reportan resultados negativos.

El medio ambiente intrauterino puede proveer una fuente de virus a los fetos. Lamara *et al.*, 2001, 2002b, demostraron que las células epiteliales del oviducto de cabras pueden ser productivamente infectadas *in vitro* con el virus de AEC. Aunque no reporta la existencia de infección de estas células *in vivo*. En adición el LPRs ha sido demostrado por análisis de PCR en oviductos de 11/25 cabras infectadas con el virus de AEC y en úteros y tejidos del oviducto (Fieni *et al.*, 2003), esto sugiere que los fetos pueden ser expuestos al virus *in vivo* (Blacklaws *et al.*, 2004).

La infección directa de embriones con el LPRs ha sido probada en diversos reportes. Recientemente se demostró que embriones caprinos de 8-16 células pueden ser infectados *in vitro* con el virus de AEC, si la zona pelucida es removida, pero no si la zona pelucida está intacta (Lamara *et al.*, 2002a), de esta manera la zona pelucida parece ser una eficiente barrera a la infección de los embriones. Los fetos pueden ser infectados con vMV por inoculación intracerebral (Georgsson *et al.*, 1978; Narayan *et al.*, 1974) o después de la inyección de virus dentro del saco y líquido amniótico (Cutlip *et al.*, 1982).

Infecciones experimentales de fetos antes de los 60 días de gestación pueden ser causa de reabsorción o abortos (Cutlip *et al.*, 1982). La infección antes del día 60 de gestación, si no causa pérdida de los fetos, podría resultar en el desarrollo de animales o crías tolerantes al LPRs (Blacklaws *et al.*, 2004).

Más evidencia de infecciones en útero proviene de la demostración de la infección con LPRs en animales recién nacidos, privados de calostro. Animales criados con leche pasteurizada o sustitutos de leche en programas de control, tienen sin explicación un 10 % de seroconversión (Rowe y East, 1997). Pocos estudios soportan esta información 1/10 cabras recién nacidas llegan a tener anticuerpos contra AEC (Adams *et al.*, 1983) y 1/24 positivos en otro estudio (Ellis *et al.*, 1983).

1.5.2 La transmisión horizontal

La transmisión horizontal se da con el contacto íntimo cabra-cabra de todas las edades, con secreciones infecciosas que incluyen: sangre, secreciones respiratorias y equipo veterinario contaminado con fluidos corporales o sangre (Adams *et al.*, 1983; Zink *et al.*, 1990; East *et al.*, 1993).

Las maquinas ordeñadoras, las manos y toallas que se contaminan con la leche, son potenciales diseminadoras del virus, por la presencia de macrófagos y células epiteliales infectadas en la glándula mamaria y contenidas en la leche, (Crawford y Adams, 1981; East *et al.*, 1993; Lerondelle, 1989; Mselli-Lakhal *et al.*, 1999). Otros instrumentos que pueden actuar como vectores mecánicos son: jeringas, tatuadores, instrumentos o equipos de descorne, contaminados con pequeñas cantidades de sangre, que pueden transportar monocitos/macrófagos infectados (Narayan *et al.*, 1983; Gendelman *et al.*, 1985).

La localización del virus de AEC en el tejido uterino de cabras, sugiere la posibilidad de la transmisión venérea del mismo, por vía sexual, pero también la transmisión vertical al embrión en el útero o por transmisión perinatal al recién nacido (Ali Al Ahmad *et al.*, 2007).

La posible transmisión sexual del virus de AEC no ha sido definida pero la presencia del virus en el semen obliga a tomar medidas preventivas.

La transmisión sexual ha sido poco investigada y se ha encontrado el virus de AEC en semen (Travassos *et al.*, 1998; Martínez *et al.*, 2005).

La transmisión sexual depende de la presencia de células infectadas en el tracto genital de los animales en etapa reproductiva. En madres infectadas el vAEC y el ADN-proviral han sido detectados en tejidos del tracto genital: útero, oviducto y ovario (Fieni *et al.*, 2003).

En machos cabríos infectados artificialmente se ha sugerido la presencia del virus de AEC en células prepuciales, plasma seminal y en células no espermáticas del eyaculado (Travassos *et al.*, 1998). La detección del virus en el eyaculado y en varios tejidos del tracto genital nunca ha sido confirmada en animales infectados naturalmente. Hay reportes que sugieren que el virus de AEC es transmitido por inseminación artificial o el apareamiento (Ali Al *et al.*, 2007).

El virus de AEC se elimina por el semen, por lo tanto no se puede descartar la transmisión venérea, tal como lo reporta Travassos *et al.*, 1998, 1999 y como sucede con otros retrovirus como el de la inmunodeficiencia humana (Van-Voorhis *et al.*, 1991), inmunodeficiencia bovina (Nash *et al.*, 1995), la leucemia felina (Jordan *et al.*, 1999) y el Maedi-Visna (De la Concha *et al.*, 1996). De la Concha demostró que solo ovinos con epididimitis, obtenía el virus en semen. Tampoco se ha documentado el efecto viral en tejido reproductor del macho.

Estudios realizados por Grewal *et al.*, 1986, reportan una seroprevalencia mayor en machos que en hembras.

El virus es muy lábil en el medio ambiente y la transmisión vía pastura o instalaciones, posiblemente no ocurra (Matthews, 1999).

1.6 Signos clínicos

La infección por el virus de AEC puede manifestarse en una gran variedad de formas clínicas:

El inicio puede ser repentino o insidioso, los signos pueden incluir: articulaciones hinchadas o inflamadas, crecidas, evidencia de dolor, rigidez, posturas anormales y baja de peso (Pétursson *et al.*, 1992; Amerighno *et al.*, 1993; Matthews, 1999).

La artritis es la forma clínica más comúnmente vista y se afectan más frecuentemente las articulaciones cárpales, pero virtualmente todas las articulaciones tienen evidencia microscópica de infección. La artritis esta asociada con una alta carga viral y altos títulos de anticuerpos en el suero y líquidos sinoviales (Perry *et al.*, 1995). La forma artrítica ocurre en animales maduros usualmente después de un año de edad.

Un incremento de la expresión viral resulta en un incremento de la inflamación de las articulaciones, la mayor parte de la lesión sinovial es debida al acúmulo de linfocitos y macrófagos.

La forma neurológica del virus de AEC es rara y más común en cabritos de 2-6 meses de edad, los signos clínicos de esta forma pueden aparecer lentamente desarrollando paresis y parálisis de los miembros (Cork *et al.*, 1974; Crawford y Adams, 1981; Rowe y East, 1997, Crawford *et al.*, 1980). Los miembros implicados pueden ser asimétricos.

En el 50% de los casos pueden ocurrir otros signos neurológicos como ceguera, una respuesta anormal de las pupilas a la luz, nistagmos, temblores de cabeza, inclinación de la cabeza y movimiento circular de la cabeza (Vitu y Russo, 1998). En la forma temprana de la enfermedad neurológica los cabritos permanecen despiertos y alertas.

El virus de AEC puede también inducir lesiones en la glándula mamaria, esta forma se caracteriza por una ubre firme e hipoagaláctica en cabras adultas y agaláctica en cabras jóvenes (Kennedy *et al.*, 1985; Lerondelle *et al.*, 1999, Smith y Sherman, 1994).

En ubres libres de infección intramamaria el conteo de células somáticas en cabras seronegativas fue significativamente más bajo que en cabras seropositivas, pero la diferencia no fue significativa en cabras con infección persistente (Sánchez *et al.*, 2001).

El virus de AEC también puede causar neumonía intersticial crónica, dificultad respiratoria y pérdida de peso (Smith y Sherman, 1994).

1.7 Epitelio de revestimiento

El epitelio de revestimiento es la superficie de contacto con el ambiente cavitario o externo y se interpone entre este y el tejido conjuntivo, con una estructura intermedia llamada lámina basal. Esta estructura está formada principalmente por colágeno y glicoproteínas. En algunos epitelios sometidos a rozamiento, como la piel, la lámina basal se fija al tejido conjuntivo subyacente por medio de finas fibras de colágeno llamadas fibrillas de anclaje. Esta lámina separa y une el epitelio al tejido conjuntivo, pero permite el paso de diversas moléculas.

La superficie libre del tejido epitelial recibe el nombre de superficie apical y puede presentar estructuras que aumentan su superficie y/o le den movimiento.

1.7.1 Capas epiteliales

Por el número de capas celulares los epitelios se clasifican en: Simples (una sola capa), estratificados (varias capas), pseudo-estratificados (núcleos de diversas alturas pero todas las células contactan con la lamina basal) (Cuadro 3).

Por la forma de sus células superficiales se clasifican en escamoso, cúbico y cilíndrico (Garfias *et al.*, 2007) (figura 3).

Cuadro 3. Descripción de los epitelios más comunes del cuerpo humano y de los animales.

Número de capas	Forma de las células	Localización de epitelios	Función
Simple	Escamoso	Revestimiento de los vasos	Facilita la movilización de las vísceras
	Cúbico	Revestimiento ovárico, tubulos renales	Revestimiento
	Cilíndrico	Revestimiento intestinal	Protección, lubricación, absorción y digestión
	Plano asociado	Peritoneo, pericardio y pleura	Protección, absorción y lubricación
Estratificado	Escamoso	Revestimiento de la piel, esófago, boca y prepucio.	Protección
	Cilíndrico	Conjuntiva del ojo	Protección
Seudo-estratificado	Cilíndrico	Revestimiento de la tráquea y los bronquios	Protección, transporte de partículas extrañas al exterior y secreción

Fuente: modificado de Garfias *et al.*, 2007.

Tipos de epitelios

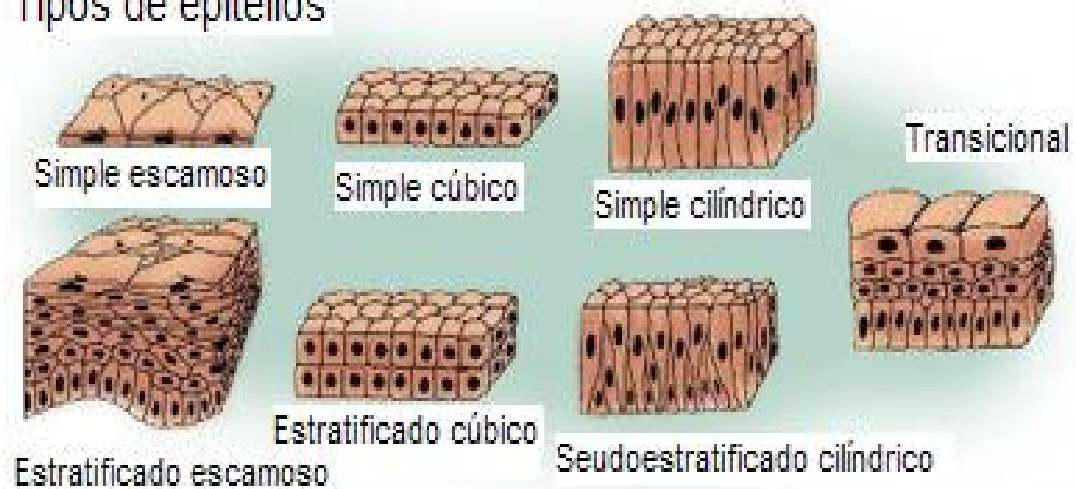


Figura 3. Tipos de epitelios (Fuente: modificado de wikipedia epitelial).

1.7.2 Prepucio

Dentro de las funciones del prepucio está cubrir, lubricar el glande, facilitar la elongación del pene al hacer eversión durante la erección y penetración en la relación sexual. También tiene glándulas apocrinas, que segregan catepsina B, lisozima, quimiotripsina, elastasa y citoquinas (Rolich *et al.*, 1993). La lisozima es similar a la que se encuentra en las lagrimas, la leche y otros fluidos corporales, que destruyen las paredes bacterianas (Cohn, 1994). En modelos animales se ha propuesto la presencia de peroxidasa y de actividad celular auto inmune en la mucosa del prepucio (Prabir, 1992). El prepucio esta ricamente vascularizado e innervado siendo un área muy sensible a estímulos de tacto y temperatura.

1.7.3 Tipos celulares del epitelio prepucial

Células basales: Son las más pequeñas y profundas del epitelio (13 y 20 μm). Son redondeadas con escaso citoplasma, núcleo redondeado y lobulado. Están adheridas a la membrana basal no pueden ser observadas en las preparaciones citológicas normales, a partir de estas se origina por división (mitosis) el resto del epitelio.

Células parabasales: Son las más pequeñas que se pueden observar en condiciones normales (25 μm). Son redondeadas a ligeramente ovals, con núcleo redondeado grande y lobulado, cantidades pequeñas de citoplasma y son las que tienen mayor actividad mitótica.

Células intermedias: Tienen un tamaño de 20-40 μm . Con un núcleo lobulado (viable), citoplasma más abundante que las parabasales, con bordes redondeados y bordes angulares.

Se dividen en:

a) **Células Intermedias pequeñas:** Aquellas que son redondeadas.

b) **Células Intermedias grandes:** Aquellas que presentan mayor cantidad de citoplasma con bordes angulares.

Células superficiales: Tienen un tamaño entre 40-60 μm . Tienen mayor cantidad de citoplasma, bordes angulares, núcleos pequeños, algunos aún viables y otros en picnosis.

Se dividen en:

a) Células superficiales, nucleares no cariopícnóticas.

b) Células superficiales, nucleares cariopícnóticas.

Células superficiales anucleadas o escamosas: Célula carente de núcleo, se les denomina cornificadas o queratinizadas (figura 4) (Atlas de citología cervico-vaginal., 2005).

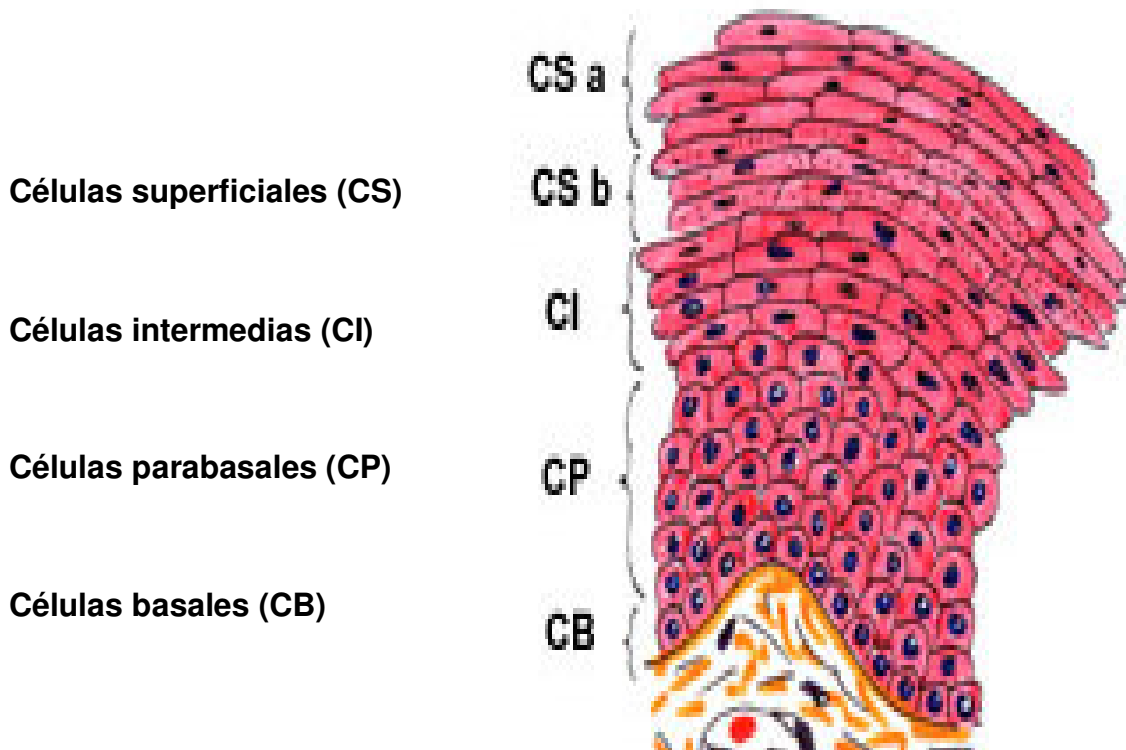


Figura 4. Capas epiteliales de la mucosa prepucial. Tejido epitelial

(Fuente: modificado del Atlas de citología cervico-vaginal., 2005).

1.7.4 La tinción de Papanicolaou

Es una tinción diferencial, policromal, que sirve para una mejor diferenciación y observación de la morfología celular. Usa tres colorantes básicos, el colorante nuclear es la hematoxilina de Harris que impregna la cromatina y una mezcla de coloración citoplasmática con naranja g, verde luz, pardo Bismark, eosina. La

hematoxilina de Harris se usa sin acidificar y proporciona un color azul oscuro a los núcleos.

El naranja g, junto con la solución de eosina alcohólica (EA) constituyen el colorante del citoplasma. La solución se encuentra comercializada bajo el nombre de OG - G, tiñe de naranja los citoplasmas celulares que contienen queratina.

1.8 Células reservorio del virus

Como reservorios del virus se han demostrado células de la médula ósea (Gendelman *et al.*, 1985; Grossi *et al.*, 2005), células dendríticas foliculares del tejido linfoide (Haase, 1986) y se ha propuesto que las células epiteliales actúen a modo de reservorio (Lerondelle *et al.*, 1999), demostrándose que las del epitelio del oviducto caprino *in vitro*, son altamente permisivas, por lo que podrían representar una importante fuente de infección (Lamara *et al.*, 2002).

A pesar de encontrarse el virus en diversos tipos celulares, puede ser difícil su detección por hibridación "*in situ*" (para detectar el genoma viral o los productos de transcripción) o tinción inmunocitoquímica de antígenos virales, incluso en estadios avanzados de la enfermedad. Posiblemente, el número de células diana o de copias del genoma es mínimo en estos casos. Esta característica de los lentivirus de los pequeños rumiantes los distingue de vIH y vIS, que infectan a las células T y pueden experimentar una replicación activa a lo largo del período de la infección (Pantaleo *et al.*, 1993; Embretson *et al.*, 1993).

Las fuentes potenciales del virus de AEC sugeridos por Travassos en los eyaculados, incluyen a los espermatozoides y células no espermáticas como los monocitos/macrófagos, células germinales inmaduras y células epiteliales (Travassos *et al.*, 1998).

Recientemente se confirmó por estudios *in vivo* e *in vitro* una eficiente replicación del virus de artritis encefalitis caprina en células de la granulosa, sugiriendo que dichas células pueden servir como productoras del virus (Lamara, 2001) (cuadro4).

Cuadro 4. Células permisivas al virus de AEC *in vitro*.

Membrana sinovial de feto caprino	Crawford <i>et al.</i> , 1980
Monocito / macrófago	Dahlberg <i>et al.</i> , 1981
Membrana sinovial fetal, plexo coroideo, pulmón y riñón	Anderson y Cheveers, 1981
Células de bazo fetal de cordero	Belov y Walley, 1988
Cultivo de células corneales	Brodie <i>et al.</i> , 1985
Células de testículo caprino	Guiguen <i>et al.</i> , 2000
Cultivo de células del endotelio aórtico ovino	Le Jan <i>et al.</i> , 2000
Cultivo de células de la granulosa	Lamara <i>et al.</i> , 2001
Cultivo de células epiteliales del oviducto caprino	Lamara <i>et al.</i> , 2002
Fibroblastos y células endoteliales	Fieni <i>et al.</i> , 2003
Células endoteliales	Lechant <i>et al.</i> , 2005
Células endoteliales y fibroblastos de medula ósea	Grossi <i>et al.</i> , 2005

1.8.1 Otros tejidos afectados por el virus de AEC

El virus de AEC también afecta tejidos como cerebro, córnea, pulmón, membrana sinovial de fetos y adultos (Anderson y Cheevers, 1981; Seroude, 2002; Rolland *et al.*, 2004), células de la granulosa, células endoteliales de la aorta, células endoteliales y epiteliales de glándula mamaria, sin embargo Travassos en 1998 y 1999, detectó la presencia del virus de AEC en semen de machos infectados en forma experimental.

Aunque existen líneas celulares permisivas de ovario y pulmón de cabra al virus de AEC y explantes de plexo coroideo, pulmón y riñón de cabra, estas presentan una reducida replicación viral, (Perk, 1999), así mismo existen otro tipo de células, como las epiteliales de cornea fetal y bazo de ovino (Belov y Walley, 1988).

Las lesiones prepuciales pueden incrementar la cantidad de células inflamatorias en el semen y favorecer la presencia del virus en el semen. Así mismo al mantener juntos a los machos con actividad sexual, propicia la monta entre ellos, lesionándose el prepucio y este puede ser un mecanismo potencial de difusión del virus (Rowe y East *et al.*, 1997).

El virus de AEC, es capaz de infectar células epiteliales de diversos órganos y la transcripción viral se ha demostrado en riñones e intestinos delgados (Zink *et al.*, 1990).

El virus de AEC además afecta células epiteliales de la glándula mamaria y la córnea *in vitro*. (Rowe y East, 1997, Mselli-Lakhal *et al.*, 1999; Belov y Whalley, 1988).

El virus de AEC puede afectar células no leucocitarias *in vivo* (Carroza *et al.*, 2003; Chi *et al.*, 2000), como células de la microglia, astrocitos, oligodendrocitos, neumocitos tipo I y II, fibroblastos mamaros, células epiteliales y endoteliales.

El virus de AEC en las células del endotelio aórtico ovino, incrementa los antígenos MHC Clase I e inicia la expresión de la adhesión de la molécula VCAM-1 (Jan *et al.*, 2000) sin citotoxicidad significativa, las células endoteliales infectadas parecen mantener su expresión de marcadores endoteliales.

El virus de Inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1) puede afectar células epiteliales (Fantini *et al.*, 1993; Howell *et al.*, 1997) o líneas celulares (Fantini *et al.*, 1993) de diferente origen incluidas las del tracto reproductor (Howell *et al.*, 1997) el intestino (Fantini *et al.*, 1993) y el colon (Yahi *et al.*, 1992), además de células epiteliales mamaras de origen humano (Toniolo *et al.*, 1995).

Estos estudios sugieren que el retrovirus del VIH-1 puede cruzar las barreras epitelio-mucosal por infección directa de células epiteliales vía transcitosis, el virus es entonces transportado de la zona apical a la membrana basal de células epiteliales, usando una vesícula transcelular (Bomsel, 1997) y podría ser transmitido a células epiteliales por linfocitos o monocitos, mediante mecanismos de contacto.

El virus de maedi-visna se replica productiva y líticamente en fibroblastos, el virus de AEC en cambio causa solamente una infección improductiva, no citopática en estas células (Narayan *et al.*, 1980).

Hay datos de que el virus de AEC causa infección en fibroblastos, pero el ciclo del virus se termina antes del ensamble de las partículas virales infecciosas. El virus de AEC no produce efecto citopático en cultivo de fibroblastos, pero el genoma del virus permanece intacto en fibroblastos inoculados y puede ser rescatado por cocultivo con células permisivas como las células de la membrana sinovial (Chebloune *et al.*, 1996).

1.9 Inmunología

Los anticuerpos de inmunidad pasiva calostrales no son detectables después de 6 meses de edad y las cabras infectadas con el virus de la artritis encefalitis caprina permanecen seronegativas por varias semanas o meses después de la infección. Estas cabras pueden eliminar al virus en la leche y otras secreciones corporales, a intervalos irregulares y pueden ser fuente de virus para animales no infectados (Knowles, 1997).

La respuesta inmune hacia los lentivirus como el de la inmunodeficiencia humana (VIH) o el virus de la artritis encefalitis caprina (vAEC), no es efectiva para eliminar el virus y permite su persistencia a largo plazo en los animales infectados (Clements *et al.*, 1996; Péterhans *et al.*, 1990; Soudeyans *et al.*, 1999). En cabras afectadas por el virus de AEC se demostró una actividad proliferativa de células T, con subsecuente desarrollo de artritis y alta viremia (Perry *et al.*, 1995).

La transmisión pasiva de anticuerpos por medio del calostro, leche o suero no protegen contra la infección. La inmunidad celular por linfocitos que pasan por calostro o leche de madres infectadas y excretoras del virus, tampoco tiene papel protector (Peretz *et al.*, 1993; Leroux *et al.*, 1997). Los animales producen una respuesta humoral detectable por la técnica de ELISA a partir de los 40 a 60 días post-infección, que alcanza un título máximo entre los días 49 al 77, decreciendo a partir de este momento, pero siendo aún detectable a los 9 meses post-infección (Robinson y Ellis, 1986). Si se presenta una reactivación viral, ocurre seroconversión en 1-2 meses (Rimstand *et al.*, 1993).

Los anticuerpos a p28, p25 y p16 (Rosati *et al.*, 1995) del vAEC persisten en cabritos infectados aún después que desaparece la inmunidad pasiva, sirviendo estos anticuerpos como forma de diagnóstico básico.

Las inmunoglobulinas aparecen de 3 a 6 meses o más tiempo de la infección neonatal y persisten variablemente después de cada reactivación viral, así mismo la tasa de anticuerpos anti-AEC varía con el estado hormonal del animal (Peretz *et al.*, 1993; Souriou, 1998).

Los animales infectados forman anticuerpos para el antígeno p28, localizado en la cápside del virus, parte del gen *gag* y son utilizados para diagnosticar la infección (Crawford *et al.*, 1980; Roberson *et al.*, 1982).

Así también se forman anticuerpos contra gp 125, gp 90 y gp 70 que se encuentran en suero y fluido sinovial, la concentración de anticuerpos a gp 125 y gp 90 exceden por 100 a 1000 veces a los de p28.

Esta alta concentración de anticuerpos en fluido sinovial a gp 125 y gp 90 correlaciona positivamente con la producción *in situ* de una gran cantidad de anticuerpos IgG1 (Mc Guire, 1987).

A diferencia de otros retrovirus, la replicación del virus de AEC no afecta la respuesta inmune, sin embargo participa en el desarrollo de lesiones.

La lesión articular puede provocar una continua activación de células plasmáticas en el espacio sub-sinovial, con aumento de IgG, células mononucleares, disminución del fluido articular, acúmulo de linfocitos de tipo CD4, CD8, linfocitos gama-delta y macrófagos que expresan el complejo mayor de histocompatibilidad tipo II, con producción de interferon alfa. El cuadro es muy semejante al de la artritis reumatoide en humanos (Zink *et al.*, 1987; Zink y Narayan, 1989; Wilkerson *et al.*, 1995).

En animales infectados con AEC se ha encontrado una baja en la actividad de células asesinas naturales (NK), factor que podría contribuir al establecimiento de una infección persistente (Mdurvwa *et al.*, 1994). Los macrófagos infectados expresan el complejo mayor de histocompatibilidad tipo II (CMH II) con la ayuda del llamado interferon lentiviral que estimula la producción de prostaglandina PgE₂, que a su vez da lugar a una replicación viral restringida, por la inhibición de la proliferación de monocitos infectados. Cuando se incrementa la actividad viral, aumenta la expresión de CMH II, estimulando a su vez linfocitos CD4, y consecuentemente se producen más citocinas y proliferan linfocitos T, hasta dar una respuesta linfocitaria proliferativa (Zink *et al.*, 1987; Zink y Narayan, 1989).

Se ha observado que animales artríticos, crónicamente infectados, con problemas de caquexia y pérdida de peso, presentan una elevada producción del factor de

necrosis tumoral alfa (TNF alfa), (Mdurvwa 1994; Werling *et al.*, 1994; Adeyemo *et al.*, 1997; Lechner *et al.*, 1996).

La variación antigénica es un mecanismo que usan los microorganismos para evitar la respuesta inmune del hospedador (Porter, 1975). Este mecanismo es bien conocido en diferentes tipos de virus, incluidos el de la influenza (Laver y Webster, 1968), la fiebre aftosa (Hyslop y Fagg, 1965), lentivirus como el de la anemia infecciosa equina (Kono *et al.*, 1973; Crawford *et al.*, 1978) y el del maedi-visna (Pétursson *et al.*, 1976).

La variación antigénica puede ser una explicación para las infecciones virales persistentes en animales.

Antigénicamente las nuevas mutaciones aumentan en un animal infectado, no son neutralizadas por la pre-existencia de anticuerpos y se pueden replicar en presencia de la cepa original del virus (Trevor *et al.*, 1987).

La variación antigénica en los lentivirus ocurre por cambios de oligonucleótidos en la región 3'- terminal del genoma viral (Clements *et al.*, 1982), que codifica para las glicoproteínas de envoltura. Estas proteínas no son detectadas por anticuerpos circulantes, evitando la neutralización viral (Narayan *et al.*, 1984; Scott *et al.*, 1979).

1.10 Diagnóstico

La detección de los animales infectados mediante pruebas serológicas resulta primordial para mantener hatos libres de esta enfermedad.

El diagnóstico serológico de la enfermedad se puede realizar a partir de muestras de suero, plasma seminal, leche y calostro, identificando los anticuerpos por pruebas de precipitación en gel de agar (IDAG) (Grewal *et al.*, 1986), pruebas inmunoenzimáticas (ELISA) (Archambault *et al.*, 1988; Heckert *et al.*, 1992; Siman *et al.*, 1999), inmunoblot (Houwens y Nauta, 1989; Ding y Xiand, 1997; Lerondelle *et al.*, 1999; Péterhans, 1999; Guiguen, 1990, 2000), virus neutralización (Cheevers *et al.*, 1991; Baba, 2000; Lamara *et al.*, 2001). La presencia del virus en el ADN de las células blanco en forma de provirus, (monocito-macrófago) se identifica por pruebas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) e hibridización *in situ* (Gopal, 1993., East, *et al.*, 1993; Rowe y East, 1997).

1.10.1 Inmunodifusión en gel de agar (IDGA)

Esta técnica es de baja sensibilidad y consiste en detectar anticuerpos precipitantes en un medio de agar con antígeno viral solubilizado en el gel. La reacción Ag-Ac genera bandas en el gel visibles a simple vista. La IDGA utiliza como antígeno el vAEC que se produce en cultivos celulares de células de membrana sinovial en plexo coroideo o pulmón fetal ovino / caprino (Cutlip *et al.*, 1977; Alkan *et al.*, 1998).

Los anticuerpos que se detectan van dirigidos a la proteína p28 en AEC y a la proteína de matriz p16 (Celer *et al.*, 1997).

1.10.2 Prueba de Elisa (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)

Es una técnica que se usa para diagnóstico inmunológico (Schoroeder *et al.*, 1985). Es de una alta sensibilidad, especificidad, rapidez y economía, permite hacer estudios de grandes poblaciones en un corto plazo, no precisa de mucho equipo, instalaciones costosas y existe la posibilidad de automatizarlo. El ensayo inmunoenzimático de ELISA, se basa en el uso de antígenos o anticuerpos marcados con una enzima, de forma que los conjugados resultantes tengan actividad tanto inmunológica como enzimática. Estando uno de los componentes insolubilizado sobre un soporte, el complejo antígeno-anticuerpo quedará inmovilizado y por tanto podrá fácilmente ser revelado mediante la adición de un substrato específico que al actuar la enzima, producirá un color observable a simple vista o cuantificable mediante el uso de un espectrofotómetro o colorímetro. (Sánchez-Vizcaíno y Cambra, 1987; Ternyinck y Avrameas, 1989).

1.10.3 Inmunocitoquímica

La técnica de inmunocitoquímica se basa en la detección de un antígeno mediante anticuerpos policlonales o monoclonales específicos. Para facilitar la visualización de la reacción se emplea un sistema de amplificación de señal, habitualmente el complejo avidina estreptoavidina-biotina (ABC) y un sistema revelador, generalmente cromógeno de diaminobenzidina (DAB). La visualización del complejo antígeno-anticuerpo se lleva a cabo en un microscopio óptico (Lawrence, 1990).

Con esta técnica se ha llegado a detectar y reportar la presencia de LPRs en distintos tejidos (Lerondelle *et al.*, 1999).

1.10.4 Cultivo celular

Es la técnica más utilizada para el aislamiento viral. Esta técnica se basa en cultivar células provenientes de tejidos o fluidos para formar monocapas para su futura infección. Estas células están adaptadas a medios artificiales que se mantienen a 37° C, con suero fetal bovino y antibióticos (penicilina-estreptomicina-griseofulvina) (Cann, 1997; Ramírez, 1998).

El tiempo de infección celular varía de semanas a meses, dependiendo de la adaptación del virus a estas condiciones: dosis infectiva, diversidad de la cepa y la virulencia del virus (Sigurdsson *et al.*, 1960).

El uso continuo de cultivos celulares permite obtener grandes cantidades de virus y antígeno para las diferentes técnicas de diagnóstico como Western Blot, ELISA, Inmunodifusión y PCR.

1.10.5 Microscopia electrónica

El uso de la microscopia electrónica (microscopio electrónico de transmisión ó TEM), permite obtener datos del número absoluto de partículas virales presentes en una preparación y presencia de la estructura viral (Cann, 1997).

1.10.6 Inmunoelectrotransferencia o Western Blot (WB)

Es una técnica serológica que permite la detección de los anticuerpos dirigidos contra las diferentes proteínas del virus previamente separadas según su peso molecular (Zanoni *et al.*, 1989), es ideal para la validación del diagnóstico serológico en otras enfermedades como el VIH / sida (Dodd *et al.*, 1990; World Health Organization, 1992; Ramírez, 2002).

Esta prueba consiste en someter los antígenos virales a una interacción específica con anticuerpos marcados directa o indirectamente, tras la separación de las proteínas virales por electroforesis en gradientes de poliacrilamida y dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE), las proteínas se transfieren a una hoja de nitrocelulosa, los lugares de unión no específicos se bloquean, las tiras se incuban con el suero y se añaden anticuerpos anti-inmunoglobulina con peroxidasa. Las reacciones se visualizan al agregar el sustrato enzimático (Amorena *et al.*, 1997). La prueba se considera positiva si se detectan al menos dos proteínas producidas por genes virales (Murphy *et al.*, 1999). La prueba de WB detecta de forma rápida los anticuerpos frente a los LPRs de infecciones naturales o experimentales (Gogolewski *et al.*, 1985; Knowles, 1997).

1.10.7 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una poderosa técnica que permite amplificar una secuencia específica de ADN en tan solo unas cuantas horas o minutos. El PCR por sus iniciales en inglés (polymerase chain reaction), es una técnica que permite producir múltiples copias de un fragmento de ADN específico a partir de una plantilla de ADN. Esta técnica se basa en la actividad de la enzima ADN polimerasa que es capaz de fabricar *in vitro* una cadena de ADN complementaria a otra ya existente, utilizando una mezcla de nucleótidos (adenina, timina, citosina y guanina) y un oligonucleótido que pueda unirse a la molécula que se desea copiar para que sirva como iniciadora, cebadora o en inglés "primer". La reacción en cadena de la polimerasa se desarrolla en tres fases. En la primera se produce la separación de las dos cadenas que forman la molécula de ADN que se quiere amplificar, para lo cual se debe calentar el ADN a altas temperaturas (94° C), cada una de estas cadenas actuará como molde para fabricar su complementaria.

En la segunda fase se baja la temperatura para conseguir que cada iniciador se una a su región específica dentro de la cadena de ADN. Por último se sintetiza la cadena de ADN complementaria por acción de la ADN polimerasa (72° C). Así tras 30 ciclos de reacción se puede obtener hasta 1 millón de copias de una molécula de ADN. La sensibilidad de la técnica de PCR es muy alta, pero pueden ocurrir falsos positivos por contaminación, para evitarlo se optimiza la secuencia de los iniciadores, así como la temperatura precisa de alineamiento para que éstos se unan al ADN en la localización correcta, asimismo, se debe realizar una adecuada manipulación de los reactivos. Hay técnicas complementarias en donde a partir de una cadena de ARN se transcribe a ADN esta técnica es la transcriptasa reversa la cual utiliza una ADN polimerasa. Por lo tanto es capaz de generar información genética en el sentido inverso al típico (ARN>ADN) de su dirección normal (ADN>ARN).

Algunos métodos para el diagnóstico de la enfermedad son más sensibles y pueden dar reacciones falsas -positivas. En general, la repetición de las pruebas cada 6 meses o cada año es recomendable debido al tiempo tan variable que requiere la seroconversión y en algunas cabras la respuesta de anticuerpos es mínima. Muchos animales infectados nunca muestran signos clásicos de la enfermedad (Reddy *et al.*, 1993; Clavijo y Thorsen, 1996).

El diagnóstico clínico de la infección no siempre es positivo ya que los signos clínicos pueden asemejarse a otros inducidos por otros agentes como

micoplasmas, brucelosis, pasteurelisis, clamidiosis, traumatismos y deficiencias de minerales (Crawford y Adams, 1981).

1.11 Prevención y control

La prevención es importante porque no hay tratamiento que elimine al virus o vacuna que prevenga la enfermedad.

Para evitar la alta prevalencia de la enfermedad en los hatos caprinos, se requiere realizar una serie de medidas en cabritos como: el uso de calostro de hembras libres de artritis, tratamiento térmico del calostro contaminado. En hembras y machos como: el manejo y la separación de animales positivos y el cuidado del manejo de biosecreciones de animales infectados (Rowe y East, 1997; Saunders, 1998; Martínez *et al.*, 2000).

El evitar una alta densidad de animales infectados y cabras susceptibles disminuye la transmisión horizontal (Rowe *et al.*, 1992), sin embargo esto no es fácil de conseguir en explotaciones intensivas.

El uso de inmunógenos experimentales contra esta enfermedad no ha permitido controlar la enfermedad, ya que se exacerban los casos de artritis (Knowles *et al.*, 1990; Russo *et al.*, 1993) y no previene adecuadamente contra el desafío.

Se han sugerido las siguientes medidas para controlar y prevenir la AEC:

Prevenir la transmisión perinatal, removiendo al cabrito al nacimiento sin que entre en contacto con secreciones de la madre, en particular evitar que ingieran calostro o leche (Ellis *et al.*, 1986).

Prevenir la transmisión por calostro o leche, para lo cual hay que calentar el calostro y leche a 56°C por una hora.

Establecer un programa de vigilancia serológica a diferentes intervalos, dependiendo de la incidencia de la enfermedad en cada explotación, pero se puede hacer cada seis meses.

Ordeñar primero los animales seronegativos.

Segregación completa de los animales seropositivos.

Evitar el riesgo potencial de transmisión iatrogénica con agujas o instrumental quirúrgico, tatuadores y aretadores.

No mezclar comederos o bebederos de animales infectados con los de cabras libres de AEC.

No realizar transferencia de embriones de hembras seropositivas.

Desinfección con cloro al 2%.

Es pertinente evaluar a la cría y reproductores con el fin de confirmar su estatus serológico, mediante pruebas de ELISA, antes de introducirlos en hatos libres y realizarles monitoreos a diferentes intervalos, dependiendo de la incidencia de la enfermedad (Peretz, 1993; Rowe, 1999).

No utilizar semen de machos seropositivos, mucho menos con balanopostitis o inflamaciones genitales.

1.12 Programas de erradicación de la enfermedad

Los programas de erradicación de la AEC requieren de métodos de diagnósticos confiables para ser aplicados en estadios tempranos de la infección, para identificar animales positivos, los cuales son separados del resto del rebaño (Robinson y Ellis, 1986). Hay que implementar planes estratégicos para evitar la exportación e importación de ganado seropositivo de Estados de la república mexicana o países donde la enfermedad este presente.

Hay que monitorear todas las explotaciones donde la enfermedad tenga una alta incidencia y establecer programas de control o erradicación mediante sacrificio de algunos animales.

1.13 Vacunas

El virus de AEC puede ser modelo de investigación para la realización de vacunas, permite formular vacunas y su monitoreo por las lesiones de artritis (Mc Guire *et al.*, 1986, 1987).

La alta variabilidad del gen *env* de los lentivirus, generó un interés por investigar mejor los antígenos de los genes *gag* y *pol* como potenciales inmunógenos contra las infecciones retrovirales.

Los péptidos del virus de AEC albergan la mayor región homóloga (MRH) de la proteína *gag* retroviral (Will *et al.*, 1991; Mammano *et al.*, 1994), la cual era casi idéntica a la del virus de maedi-visna. El uso de vacunas basadas en los péptidos *gag* como acarreadores universales, puede inducir falsos-positivos con los virus de los pequeños rumiantes en pruebas serológicas (Alexandra *et al.*, 2006).

1.14 Justificación

Hasta el momento no se ha probado que las células epiteliales del prepucio de caprinos son permisibles al virus de la artritis encefalitis caprina. El presente estudio pretende demostrar que este tipo de células epiteliales pueden servir como reservorios del virus para diseminar la enfermedad. Se han realizado trabajos donde se sugiere que el eyaculado sirve como un medio de transporte de virus, en este trabajo consideramos demostrar una de las vías, por la cual el virus podría estar diseminándose en el hato.

1.15 Hipótesis

Si las células epiteliales del prepucio caprino son permisivas al virus de AEC entonces podrían ser fuente de virus para el semen o las secreciones genitales del macho.

2. Objetivo general

Establecer el efecto del virus de la artritis encefalitis caprina en células epiteliales del prepucio caprino *in vivo* e *in vitro*.

2.1 Objetivos particulares

- ❖ Obtener células epiteliales del prepucio caprino y establecer cultivos celulares primarios.

- ❖ Replicar el virus de la AEC en células epiteliales de prepucio *in vitro*.

- ❖ Identificar la presencia del virus en células epiteliales de prepucio en cultivo primario infectado y en lavados prepuciales de animales seropositivos mediante la técnica de inmunocitoquímica.

- ❖ Identificar al virus en células de prepucio de fetos de cultivos primarios y en células epiteliales prepuciales de animales seropositivos por medio de la técnica de PCR.

3. Material y métodos

3.1 Metodología para la obtención de células a infectar de origen fetal

Se colectaron fetos ovinos y caprinos en condiciones lo más asépticamente posible, del rastro municipal de Tlalnepantla, para la obtención de muestras de prepucio, para realizar explantes y cultivos primarios y obtener células epiteliales y fibroblastos, los cuales se infectaron con la cepa del virus (R) VR905, CAEV, 75-G63, clonod lot. 2D, 91-12, 1ml, ATCC (American type culture collection), para después realizar la técnica de inmunocitoquímica.

Se desinfectaron los fetos obtenidos con una solución de superóxido de pH neutro (Estericide o Microsin) y se flameó la zona del prepucio para eliminar la posible carga bacteriana. Se cortó la zona del prepucio y se introdujo en solución de Hank's con antibiótico al 1% (Penicilina 10,000 UI–Estreptomicina 250 mg), se lavaron 2 veces por agitación, para posteriormente cortar el tejido en pequeños fragmentos (0.5 mm), y se raspó el tejido con bisturí y se centrifugó a 1500 xg durante 3 minutos, para después poner las células obtenidas en cajas Falcón y laminillas, con medio de cultivo Glasgow para su crecimiento, con 10 % de suero fetal bovino y antibiótico al 1% (Penicilina 10000 UI–Estreptomicina 250 mg).

En ocasiones se realizaron diversas técnicas como tripsinización, raspado del tejido y macerado para la obtención y estandarización del cultivo de células prepuciales.

Los medios de cultivo usados para que las células crecieran y se mantuvieran fueron el de Glasgow y MEM, con diferentes concentraciones de suero fetal bovino (10%, 8%, 5%, 2%).

Se usaron explantes para que el tejido soltara células y formara una mejor monocapa de fibroblastos y células epiteliales durante un periodo de 10-15 días.

Las monocapas de células epiteliales y fibroblastos con una confluencia del 60%, se infectaron con el virus de ATCC, con título infectante de 1:100 UFP, en dosis de 0.5 ml y posteriormente se les realizó la técnica de inmunocitoquímica a los 7 y 14 días pos-infección.

3.2 Metodología para la obtención de células prepuciales de machos adultos seropositivos y seronegativos.

Se utilizaron tres machos caprinos adultos seropositivos (n=3) y tres seronegativos (n= 3) a la enfermedad de AEC, por la prueba de ELISA indirecta, de raza alpina y

toggenburg. La zona del prepucio se rasuró, limpió y desinfectó. Para la obtención de células prepuciales se introdujeron 10 ml de solución de Hank's estéril, sin glucosa, con antibiótico al 1% (Penicilina 10000 UI-Estreptomicina 250mg), pH 7.2, con pipeta estéril de 30 cm. de largo. Se masajeó por 15 a 20 segundos para después recolectar la mayor cantidad de líquido. La solución se recolectó en tubos de plástico de 15 ml estériles. Las muestras se centrifugaron a 200 xg durante 5 minutos. Se retiró el sobrenadante y se realizaron frotis con las células del sedimento que se fijaron en portaobjetos con alcohol etílico durante 10 minutos y se secaron al aire. Se utilizó la tinción de Papanicolaou, para la observación de tipos celulares y su cuantificación celular (se realizaron 12 muestreos cada 20-30 días).

Con la técnica de lavados prepuciales también se elaboraron cultivos celulares primarios a partir de células de lavado.

Se realizaron 5 lavados con solución de Hank's con antibiótico al 1% (Penicilina 10000 UI-Estreptomicina 250mg) a las células obtenidas y se centrifugaron a 1000 xg en cada lavado. En el primer y segundo lavado se centrifugó por 1 minuto y en el tercero, cuarto y quinto lavado se centrifugó por 2 minutos.

Una vez lavadas las células se procedió a ponerlas en portaobjetos planos estériles y se les agregó de 100-300 microlitros de medio de cultivo de Glasgow, con 10% de suero fetal bovino todos los días, para el crecimiento celular.

Estos cultivos no se infectaron experimentalmente ya que provenían de animales seropositivos.

Los cultivos se observaron y mantuvieron de 7 a 14 días, para después realizar la técnica de inmunocitoquímica.

3.3 Metodología para la obtención de células prepuciales para la técnica de inmunocitoquímica.

Las células infectadas de los cultivos celulares se fijaron en portaobjetos con acetona durante 10 minutos y se secaron al aire. Para la técnica de inmunocitoquímica se utilizaron anticuerpos monoclonales, Veterinary Diagnostic Test kits & Reagents (VMRD), CAEV Antibodies MoAbs (p28) (CAEV-63, CAEV-Co, MVV, OPP), de origen ratón ascítico, del isotipo IgG1, línea celular CAEP5A1.

De las células epiteliales obtenidas por lavado prepucial en los machos, se elaboraron frotis fijados con acetona con el fin de realizar la técnica de

inmunocitoquímica para la observación de antígeno viral, se realizaron 5 muestreos, 1 cada 30 días.

Se tenían dos grupos testigos negativos, tanto de los cultivos celulares como de los lavados prepuciales, en un grupo testigo de muestras de animales seronegativos, se seguía toda la técnica descrita y en el otro grupo testigo, a partir de muestras de animales seropositivos, se seguía toda la técnica a excepción del uso de anticuerpos monoclonales para verificar que la técnica funcionara (figuras 10 y 11).

Para el conteo de células epiteliales prepuciales, se contaron 300 células de cada animal y dentro de esas células se contaron las que tenían marcaje de la proteína p28 por la técnica de inmunocitoquímica y se obtuvo un promedio de células marcadas (cuadro 5).

3.4 Metodología para la técnica de PCR

Se hicieron mezclas de los muestreos 10, 11 y 12 de todos los animales seropositivos y seronegativos, se extrajo el ADN de las células epiteliales prepuciales por dos técnicas: Con reactivos preparados en el laboratorio y con el mini Kit QIAamp DNA para 50 muestras.

Se hidrataron los iniciadores en diferentes concentraciones 40 pmol, 20 pmol y 5 pmol y se separaron a diferentes volúmenes 100µl, 50 µl, 20µl y 10 µl para poder trabajar la PCR.

La secuencia del iniciador del vAEC japonés de avance utilizadó fue:

5' CAA GCA GCA GGA GGG AGA AGC TG 3' y

La secuencia del iniciador de reversa fue:

5' TCC TAC CCC CAT AAT TTG ATC CAC 3' (Konishi *et al.*, 2004).

Estos iniciadores amplifican 297pb y están contenidos dentro del gen *gag* en la posición 953-1249, el cual es altamente conservado por transcribir proteínas de nucleocápside del virus y se verificaron en el GenBank [M33677](#).

Se calculó la temperatura de fusión (T_m), para la amplificación de los iniciadores utilizados, la óptima fue de 57.5°C.

Se trabajó con un termociclador Mastercycler gradient Eppendorf.

Las condiciones y programas utilizados fueron:

Condiciones iniciales para las PCRs de las células epiteliales prepuciales.

Buffer 10x	2 μ l
dNTPs 10Mm	0.4 μ l
Mgcl ₂ 30 Mm	1.25 μ l
Iniciador Fw 5pmol	1 μ l
Iniciador Rv 5pmol	1 μ l
ADN 200ng (depende la concentración del ADN se ajusta)	
H ₂ O iny. cbp	-----

20 μ l volumen final

Programa.

94 °C / 5 minutos	} 34 ciclos
94 °C / 30 segundos	
57.5 °C / 30 segundos	
72 °C / 90 segundos	
72 °C / 5 minutos	
4 °C / α	

Como grupo control se concentró el virus de la artritis encefalitis caprina de sobrenadantes de cultivos de membrana sinovial y se obtuvo el ARN viral con ayuda del mini Kit para RNA, se realizó la transcripción de ARN a cADN con ayuda de la transcriptasa inversa (Súper Script) y la técnica de RT-PCR.

Técnica de transcriptasa reversa (RT) con enzima súper script. Condiciones para la RT.

1 μ l Oligo DT	} 10 min/ 70 °C	} 8 μ l Máster Mix	} cDNA
10 μ l ARN diluido			

Colocar en el termociclador por 1 hora a 37 °C.

El Máster Mix contiene:

5 μ l de Firsh Strand Buffer 5x.

2 μ l de DTT 0.1 M.

1 μ l de dNTPs 10mM.

Se realizaron PCRs con las cADN.

Condiciones iniciales para las cADN

Buffer 10x	2 μ l
dNTPs 10Mm	0.4 μ l
Mgcl ₂ 30 Mm	1.25 μ l
Iniciador Fw 5pmol	1 μ l
Iniciador Rv 5pmol	1 μ l
Taq pol. 5U/ μ l	0.15 μ l
ADNc	2 μ l
H ₂ O iny. cbp	12.2 μ l

20 μ l volumen final.

Programa.

94 °C / 5 minutos	} 34 ciclos
94 °C / 30 segundos	
55 °C / 30 segundos	
72 °C / 90 segundos	
72 °C / 5 minutos	
4 °C / α	

Se realizó adicionalmente la amplificación de un gen constitutivo que ya estaba estandarizado, para saber si el ADN de las muestras de las células prepucciales epiteliales por trabajar, era funcional o no. Se utilizó para este fin el iniciador de la hipoxantinafosforibosiltransferasa (HPRT) humana.

La secuencia del iniciador de HPRT humana de avance utilizadó fue:

TTG CTG ACC TGC TGG ATT AC

La secuencia del iniciador de reversa fue:

CTG ACC AAG GAA AGC AAA GT

Estos iniciadores amplifican 229pb.

Condiciones iníciales para los HPRT

Programa

Buffer 10x	2 μ l	95 °C / 5 minutos	} 35 ciclos
dNTPs 10Mm	0.4 μ l	94 °C / 30 segundos	
Mgcl ₂ 30 Mm	1.25 μ l	50 °C / 30 segundos	
Iniciador Fw 5pmol	1 μ l	72 °C / 30 segundos	
Inciador Rv 5pmol	1 μ l	72 °C / 10 minutos	
H ₂ O iny. cbp	11.85 μ l	4 °C / α	

17.5 μ l volumen Máster Mix.

Taq pol. 5U/ μ l	0.5 μ l
ADNc ó ADN	2 μ l
Máster Mix	17.5 μ l

20 μ l volumen final.

4. Resultados

4.1 Células de origen fetal

Los cultivos primarios de células prepucciales fetales (epiteliales y fibroblastos) se lograron mantener por dos semanas con una confluencia del 60%.

Cinco cultivos primarios con explantes tuvieron un tiempo promedio de 3 semanas de vida, durante ese tiempo, el tejido seguía liberando células y se observó un 70% de confluencia.

El medio de cultivo más adecuado para estos monoestratos fue el medio de Glasgow con 10% de suero fetal bovino (figura 5).

No se observó efecto citopático (ECP), en los cultivos infectados experimentalmente.



Figura 5. Células de origen fetal en diferentes días de cultivo en medio Glasgow con 10% de suero fetal bovino (fotos 1000x y 400x).

4.2 Células de lavado prepuciales

En los cultivos primarios a partir de células prepuciales obtenidas por lavados de machos adultos, el tiempo promedio que duraron las células fue de 2 semanas a 40 días, en medio de Glasgow con 10% de suero fetal bovino.

Después de 16 días de cultivo, se observaba que una gran cantidad de células se despegaban de la superficie, en proporción de hasta el 60% (figura 6).

No se observó ECP en los cultivos de lavados prepuciales de los machos infectados.

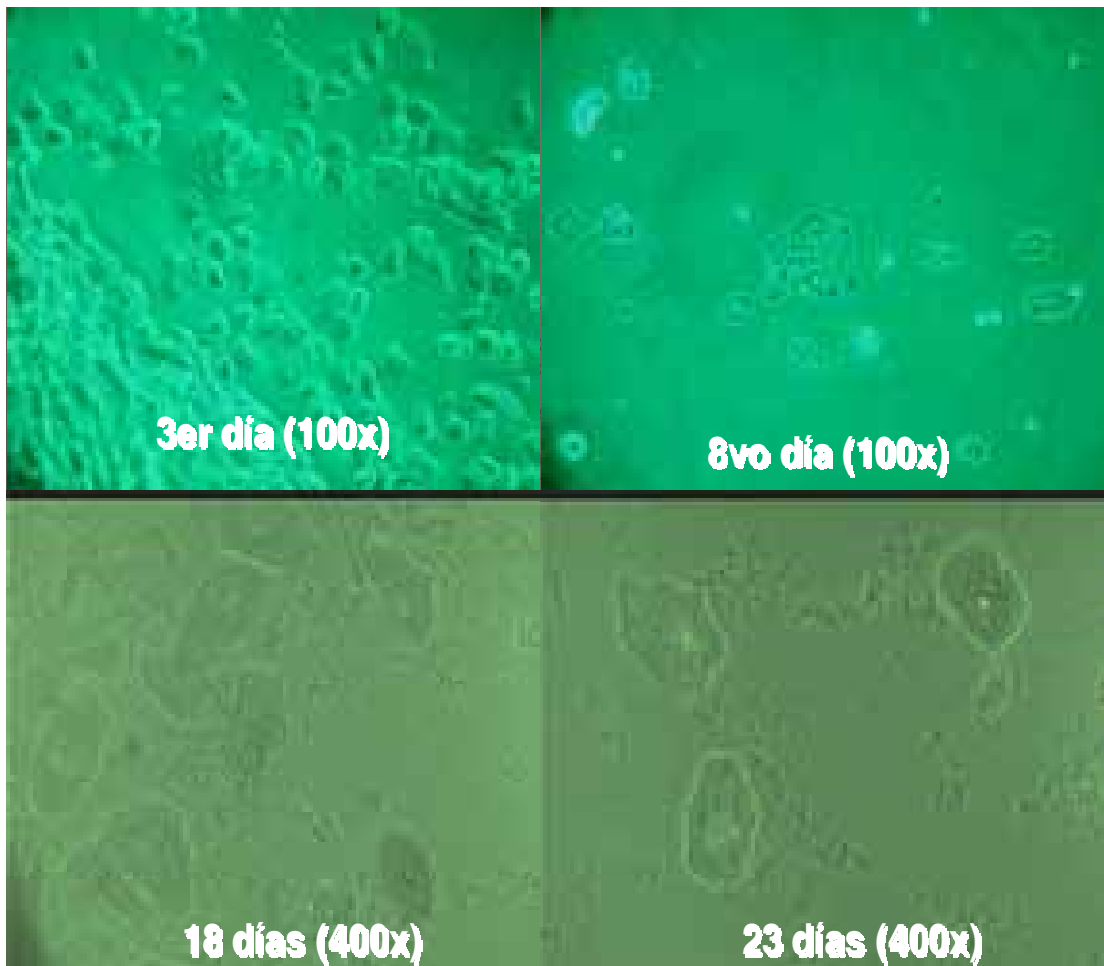


Figura 6. Células epiteliales en cultivos celulares en medio Glasgow con 10% de suero fetal bovino de lavados prepuciales (fotos 100x y 400x).

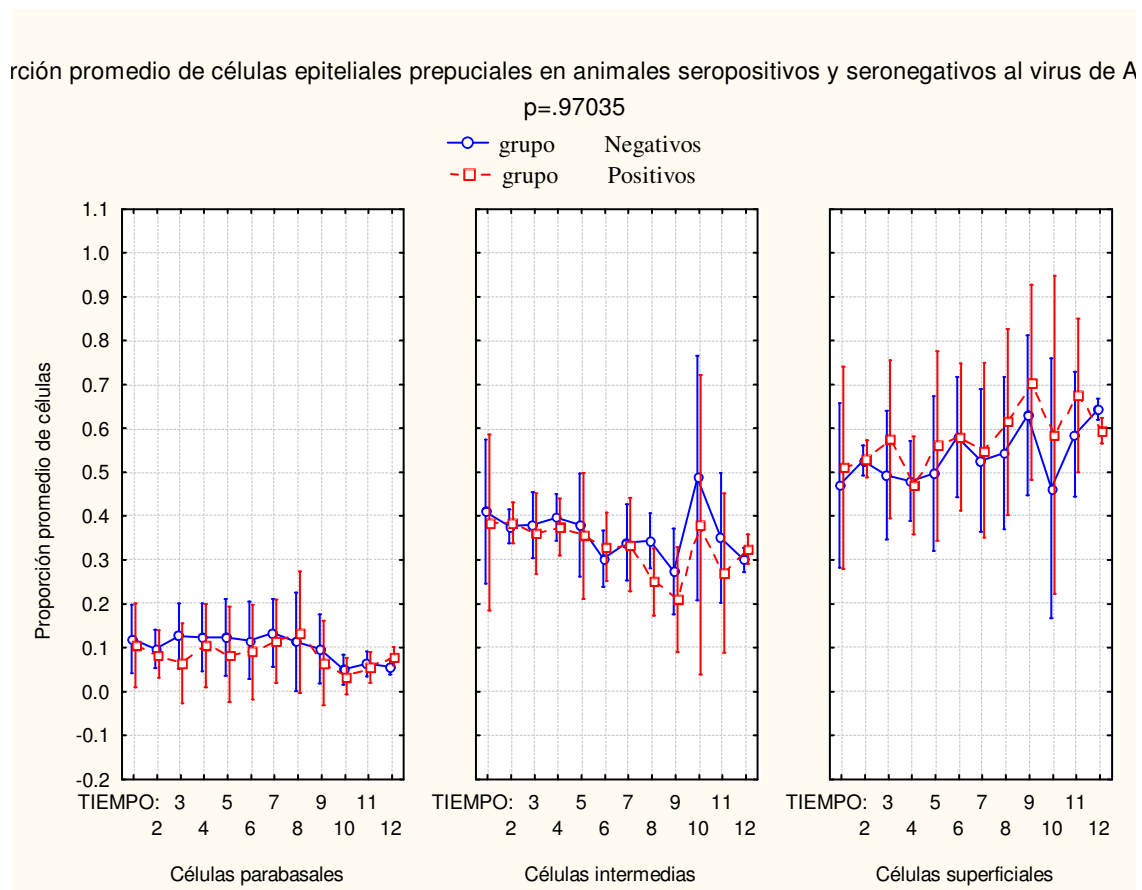
4.3 Tipos celulares prepuciales

Mediante la coloración de Papanicolaou se distinguieron los diferentes tipos celulares presentes en los frotis (células parabasales, intermedias, superficiales, granulocitos, linfocitos y monocito/macrófago) (figuras 7 y 8).

A estos frotis se les realizó un conteo diferencial con el programa de Statistica 6 (repeated measures ANOVA), de las células epiteliales prepuciales (parabasales, intermedias y superficiales), gráfica 1 y células leucocitarias (granulocitos, linfocitos y monocito/macrófago), gráfica 2.

A los resultados se les realizó un análisis de varianza considerando tres factores y un diseño con observaciones repetidas. Se analizaron los efectos sobre la proporción de células prepuciales, de la condición del animal (seropositivo ó seronegativo), del tipo de células y del tiempo transcurrido a partir del primer muestreo, sin que se presentaran efectos atribuibles a la condición serológica de los animales para AEC ($p > 0.05$).

Gráfica 1.



En la gráfica 1 se observa que la proporción de células epiteliales exfoliadas de los animales seropositivos al virus de AEC, es similar que la de los animales seronegativos, sin diferencia estadística significativa.

También se puede observar que la proporción de los diferentes tipos de células, refleja su facilidad de desprenderse de acuerdo a su disposición en el tejido, es decir se desprenden en mayor cantidad las células superficiales y en menor cantidad las células parabasales.

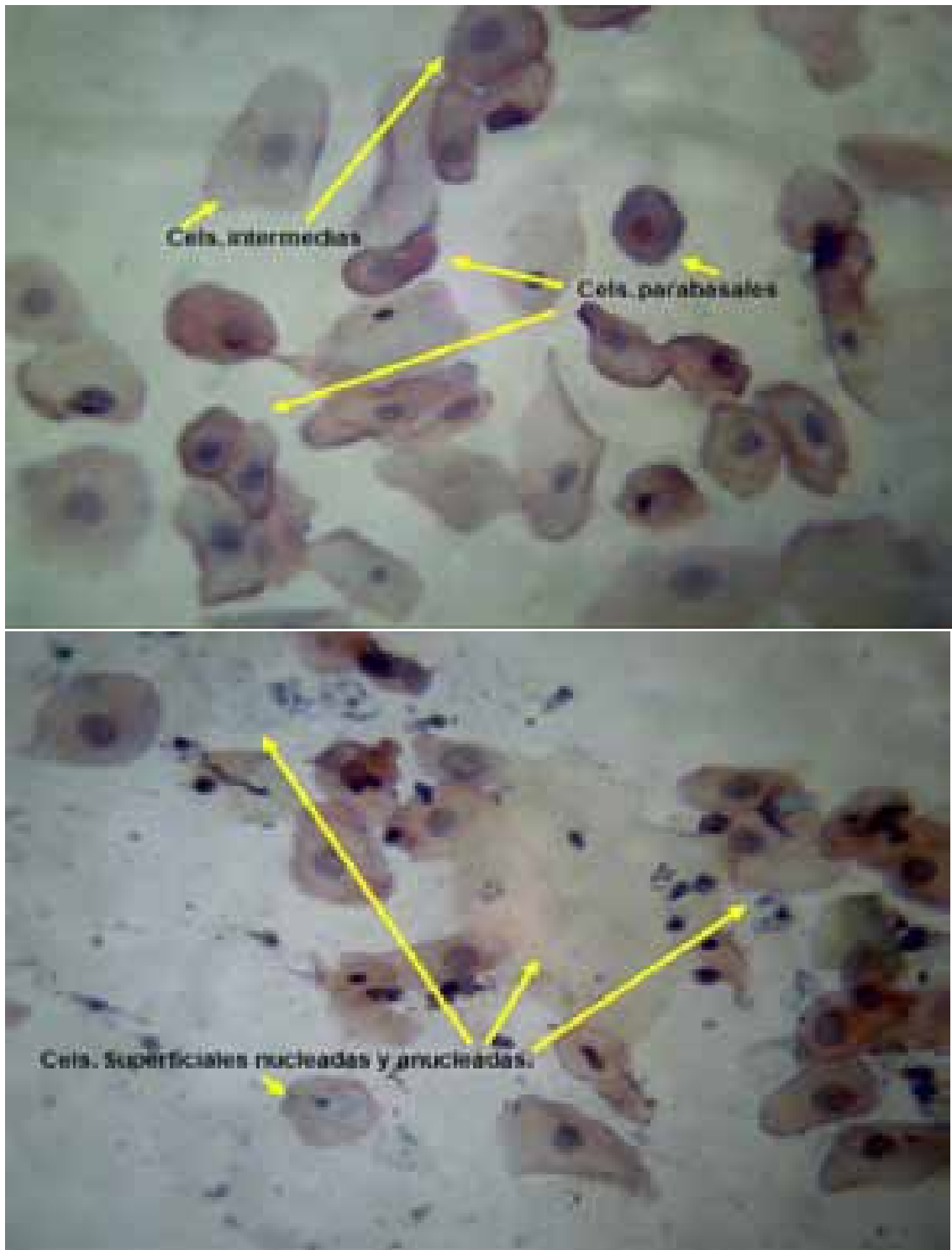


Figura 7. Diferentes células epiteliales prepuciales observadas mediante la tinción de Papanicolaou, las flechas indican los tipos de morfología celular presentes en los frotis (400x).

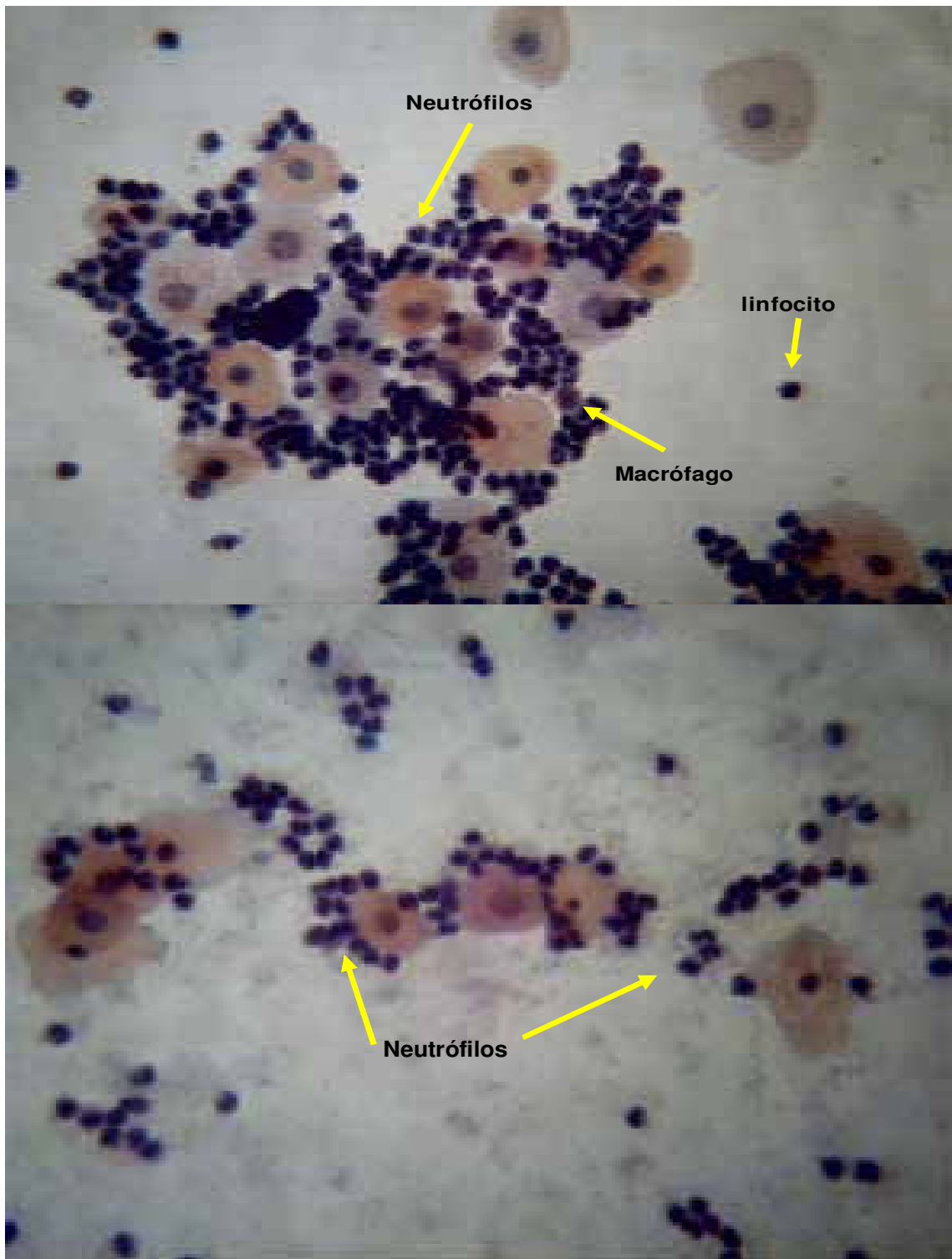
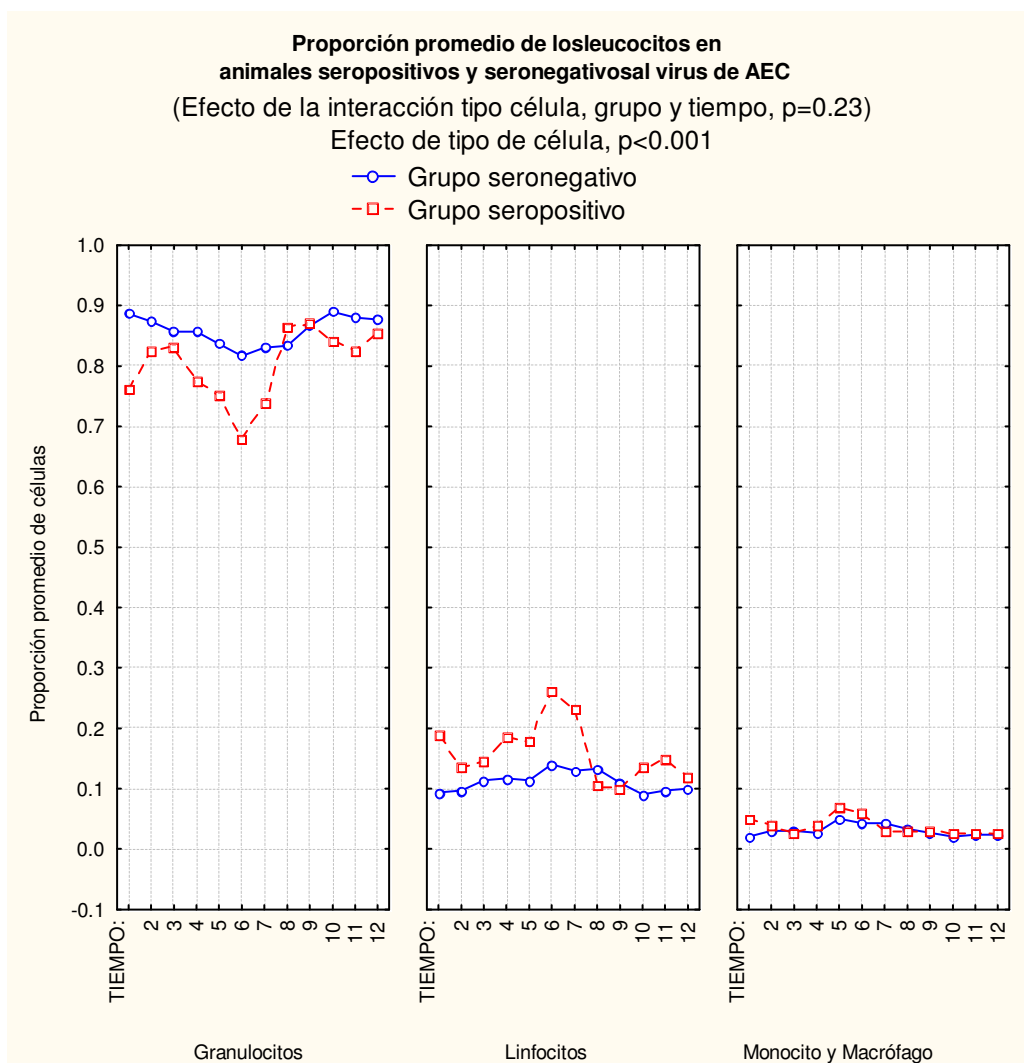


Figura 8. Diferentes tipos de leucocitos observados mediante la tinción de Papanicolaou, las flechas indican los tipos de morfología celular presentes en los frotis (400x).

Gráfica 2.



En la gráfica 2 se presenta la variación en las células de tipo leucocitario y no ocurrió una diferencia significativa entre los animales seropositivos y los seronegativos entre los muestreos y los diferentes leucocitos.

Se presentó diferencia estadística, al comparar el tipo de célula leucocitaria presente en el lavado prepucial, estas diferencias no son atribuibles al vAEC y si a la presencia normal de estas células en prepucio.

Los tiempos en las gráficas se refieren a los muestreos realizados cada 25 días.

4.4 Técnica de inmunocitoquímica.

Con respecto a la técnica de inmunocitoquímica realizada en los cultivos celulares de feto caprino y ovino infectados experimentalmente, se detectó la presencia del antígeno viral (p28), en células fibroblásticas a pesar de que no ocurrió efecto citopático o cualquier otra alteración (figura 9).

También se utilizaron cultivos celulares de feto caprino sin infectar como control negativo (figura 10) y células de lavados prepuciales de animales seronegativos al virus de AEC, también como control negativo (figura 11).

En las células epiteliales de los lavados prepuciales de los animales seropositivos al virus de AEC, se detectó también la presencia del antígeno viral, en los diferentes tipos de morfología celular presente, encontrándose en mayor cantidad el marcaje en las células superficiales e intermedias respectivamente y en menor cantidad en las células parabasales (figuras 12 y 13).

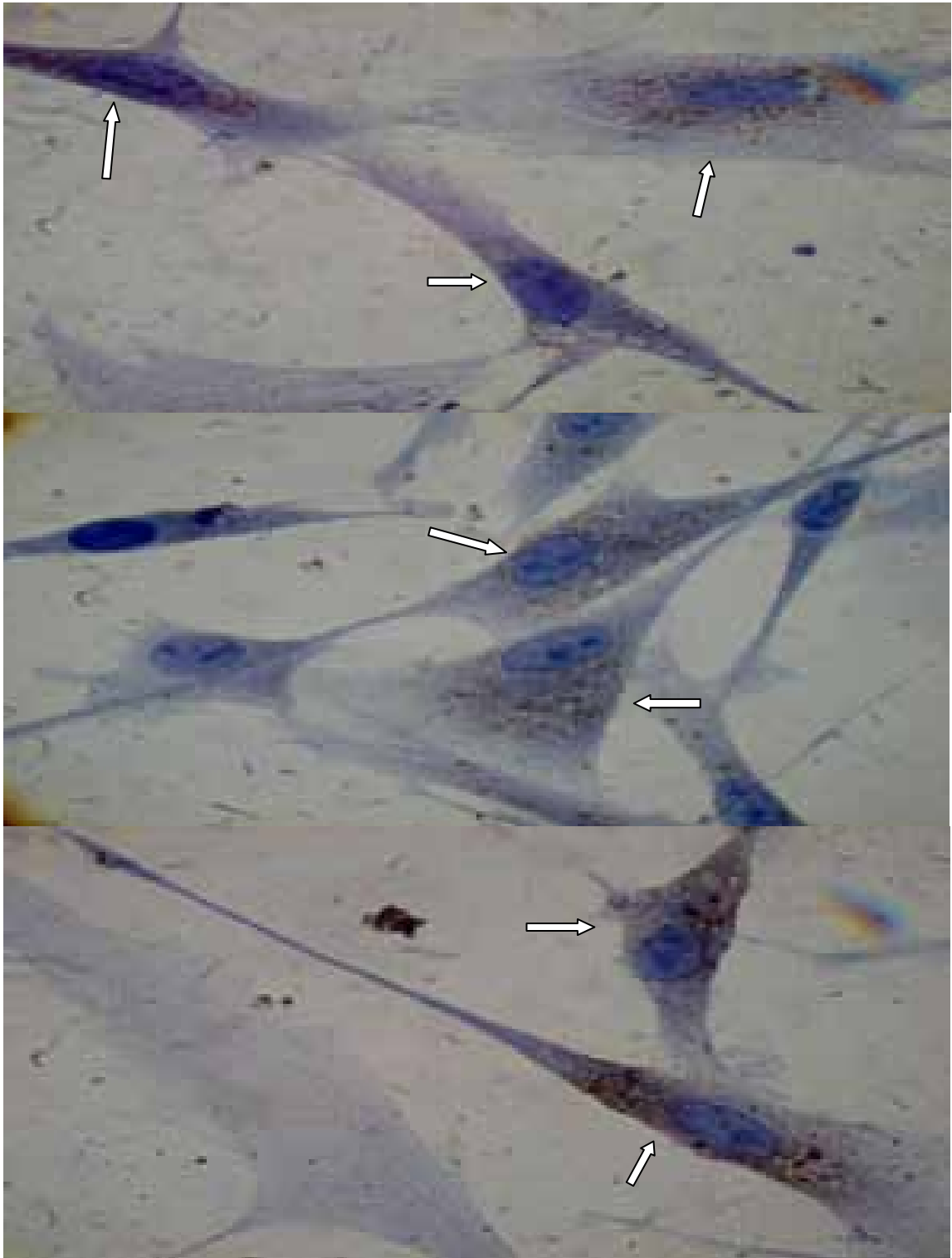


Figura 9. Fotos de cultivo de fibroblastos de feto ovino infectado experimentalmente con el virus de AEC, las flechas indican células, positivas a AEC (1000x).

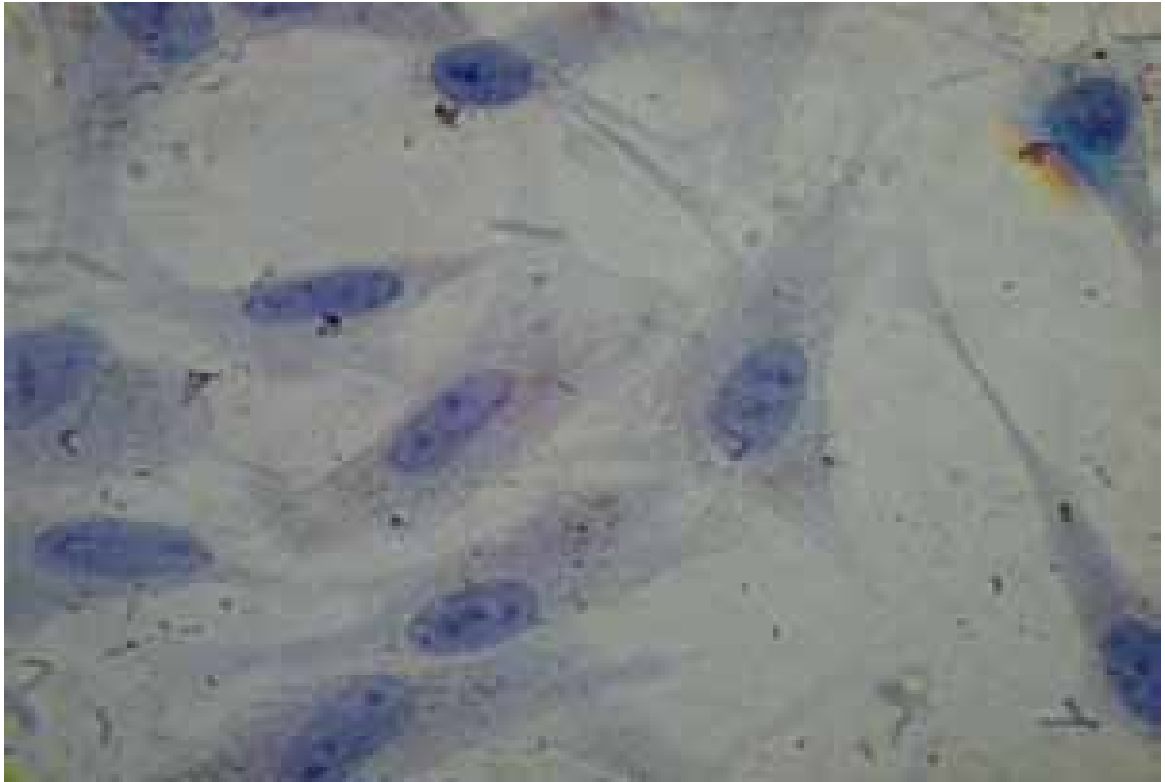


Figura 10. Foto de cultivo celular de fibroblastos de feto ovino (control testigo) (1000x).

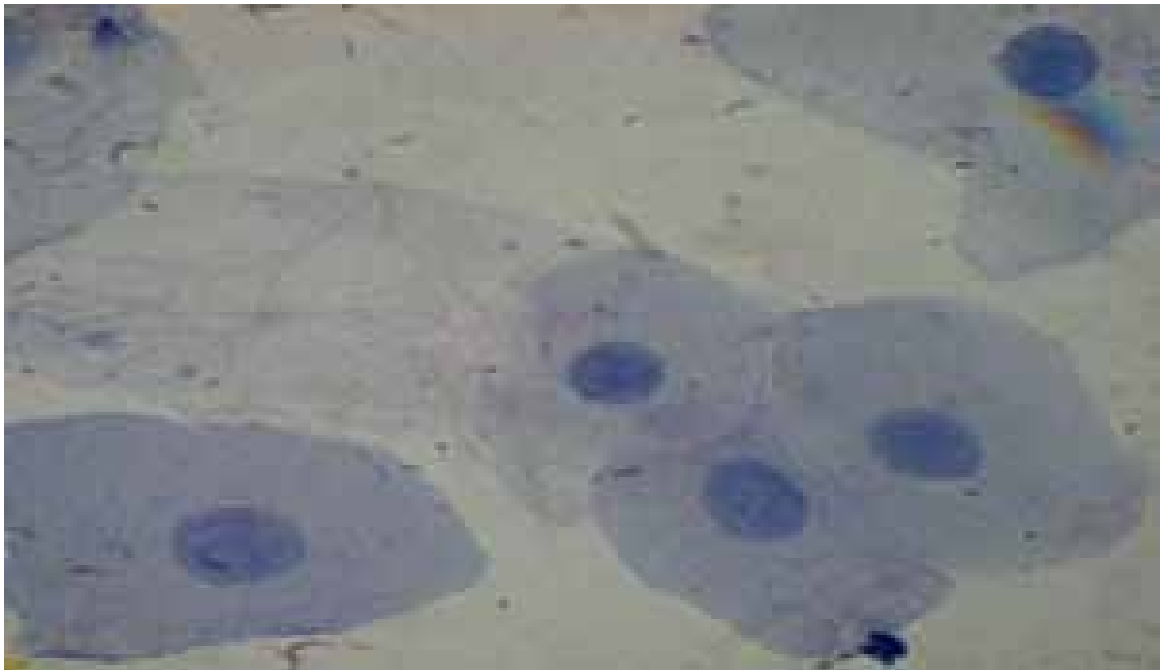


Figura 11. Foto de células epiteliales de lavado prepucial de caprino seronegativo (control testigo) (1000x).

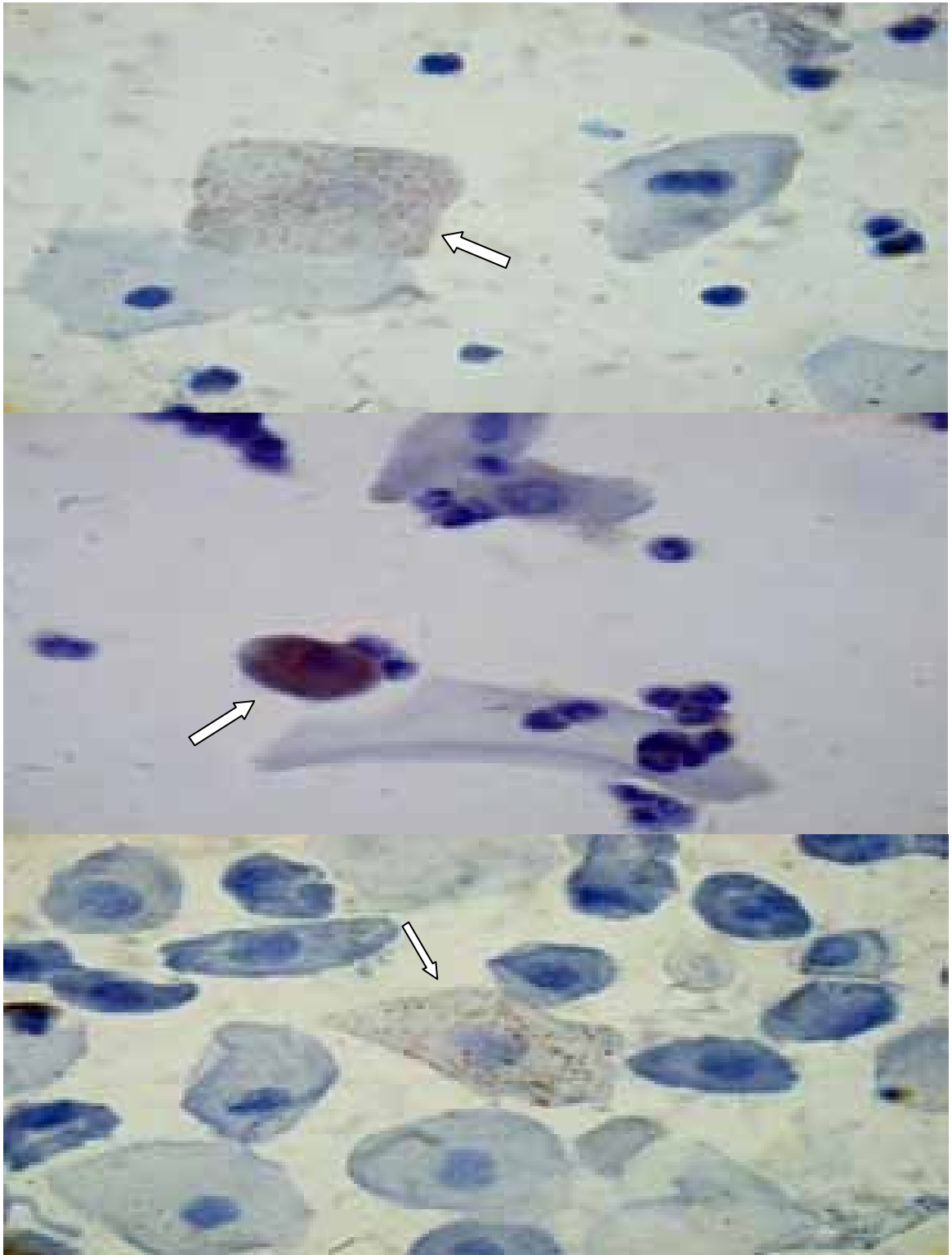


Figura 12. Fotos de lavado prepucial, se observan células epiteliales de caprinos seropositivos a AEC, las flechas indican las células positivas al virus (1000x).

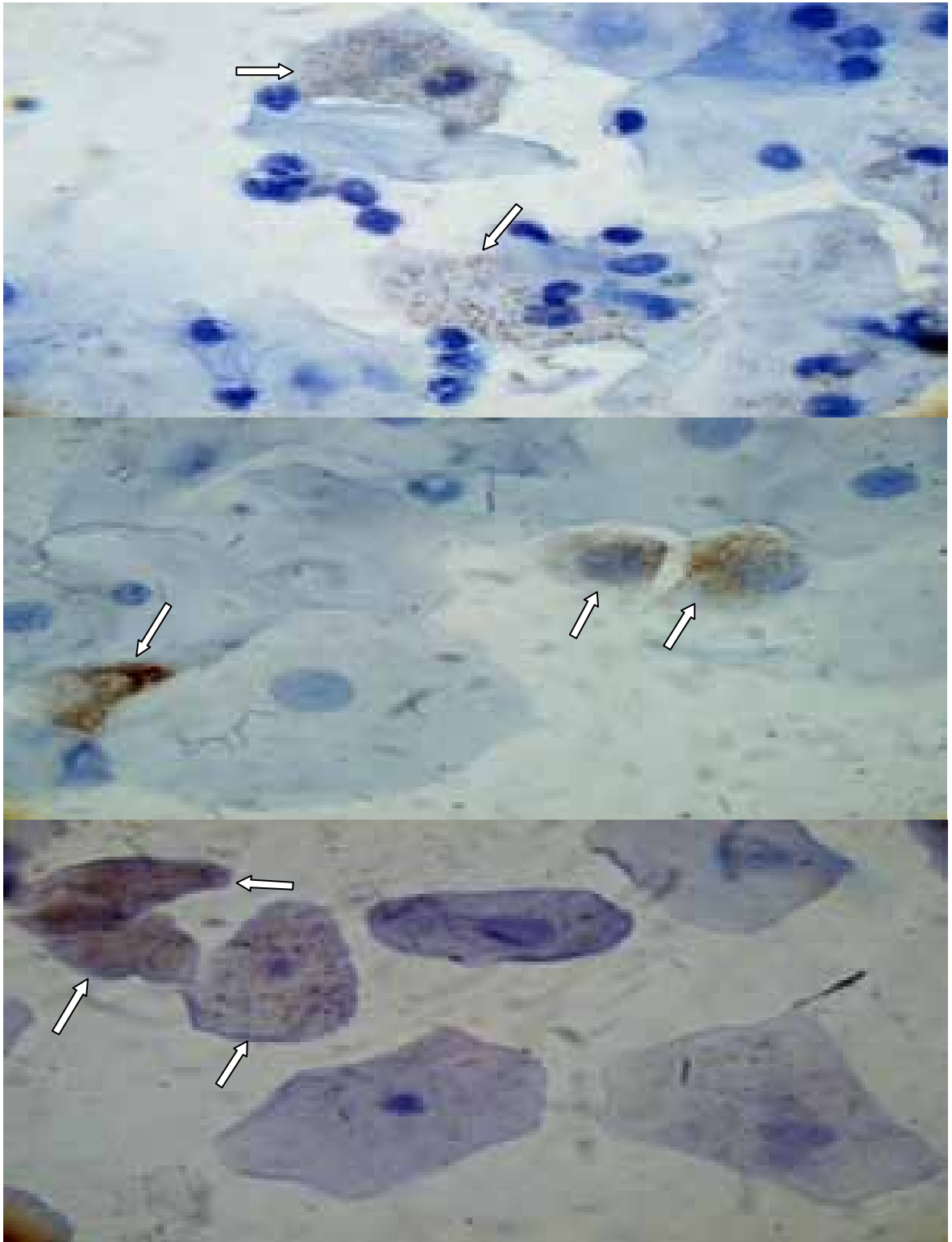


Figura 13. Fotos de lavado prepucial, se observan células epiteliales de caprinos seropositivos a AEC, las flechas indican las células positivas al virus (1000x).

4.5 Análisis de proporción de células marcadas

Porcentaje de células epiteliales marcadas. El porcentaje se calculó a partir del conteo de células en 5 muestreos independientes. Se contaron en total 500 células epiteliales de cada animal, de las cuáles en promedio (\pm desv. est.), se encontraron 32 (\pm 4), 185.8 (\pm 11) y 282.2 (\pm 11) de los tipos parabasales, intermedias y superficiales respectivamente.

Cuadro 5. Conteo Promedio de células epiteliales marcadas.

Animales seropositivos	Porcentaje de tipo de células epiteliales marcadas		
	Parabasal	Intermedia	Superficial
1 Cle.	0	2.7	3.9
2 Jua.	0	3.0	3.9
3 Vic.	11.1	6.0	6.2
4 Hug.	6.2	4.9	3.9
5 Rub.	0	5.2	1.1

Para comparar la proporción promedio de los diferentes tipos de células marcadas se realizó un análisis de varianza para un experimento en bloques. Este análisis indicó que no hay evidencia suficiente para decir que hay una relación entre la proporción de células marcadas y el tipo de célula ($p > 0.05$). El porcentaje promedio estimado de células marcadas es de 3.5%.

4.6 Técnica de PCR

Se observaron amplificadores de 297pb, los cuales correspondieron a ADN proviral en células epiteliales prepuciales de animales seropositivos al virus de AEC y cADN que correspondió al virus de AEC, obtenido del sobrenadante de cultivos celulares de membrana sinovial (control positivo).

Al realizar el PCR de la cADN viral, el amplificador que se obtuvo fue de 297pb que era el esperado (figura 14).

Una vez estandarizada la técnica se corrieron las muestras problemas de los animales muestreados (ADN de células epiteliales prepuciales de animales seropositivos, seronegativos y de cultivos celulares fetales) y se observaron los amplificadores de 297pb en las células epiteliales de dos animales seropositivos infectados artificialmente con el virus de referencia y también en un cultivo celular de fibroblastos de feto ovino infectados con el virus de referencia (figura 15).

Para corroborar si el ADN de las muestras de células epiteliales prepuciales era funcional o no, se corrieron otros PCRs con el gen constitutivo de la hipoxantinafosforibosiltransferasa (HPRT humano) que ya se tenía estandarizado, este gen codifica enzimas que al faltar producen hiperuricemia. Se constató que este gen también está presente en el ADN de las cabras y ocurrieron amplificados con estos iniciadores (figura 16).

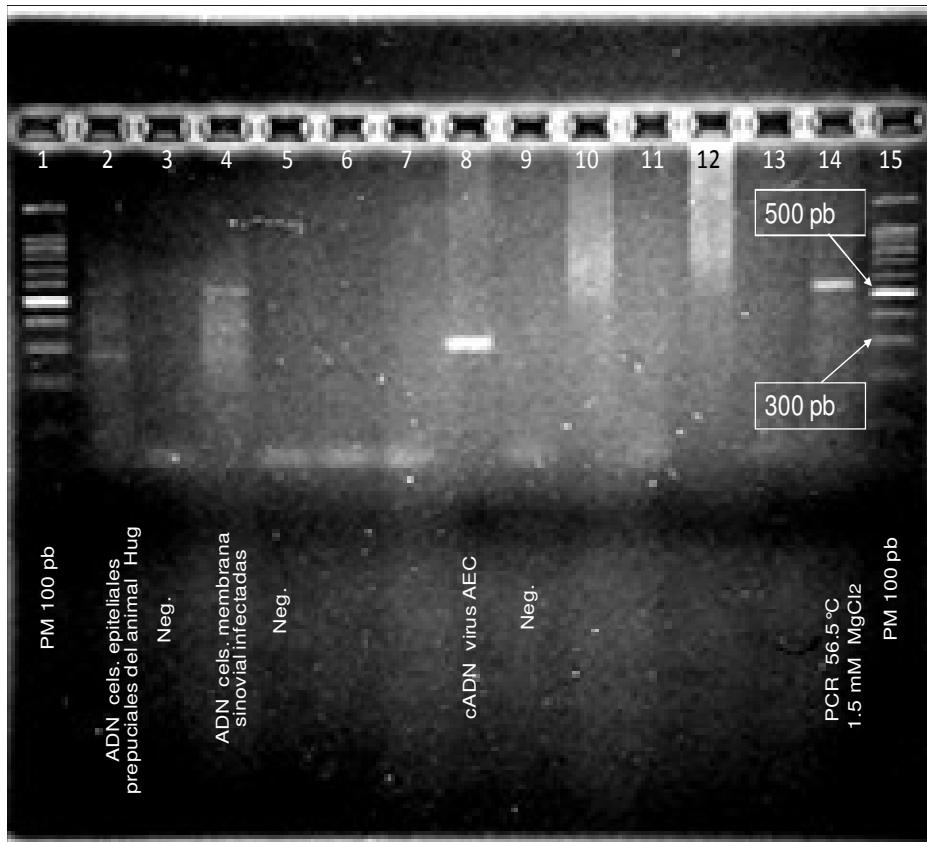


Figura 14. Amplificados a partir de ADN y cADN de células epiteliales de un animal seropositivo y del virus de AEC. Electroforesis en gel de agarosa al 2%, MgCl₂ 1.5mM.

En el carril 1 de las figuras 14, 15 y 16, se observa la escalera (lander) que indica el número de pares de bases de los amplificados.

En los carriles 2 y 8 se observan dos amplificados de 297pb, el carril 2 corresponde a una muestra de ADN de células epiteliales prepuciales de un animal seropositivo al virus de AEC y el carril 8 corresponde al cADN del virus de AEC (muestra testigo). En los carriles 4 y 14 se observa un amplificado de aproximadamente 560pb, el carril 4 corresponde a una muestra de ADN de células

de membrana sinovial infectadas con el virus de AEC y el carril 14 corresponde a un amplificado de ADN de células epiteliales prepuciales de un animal seropositivo al virus de AEC.

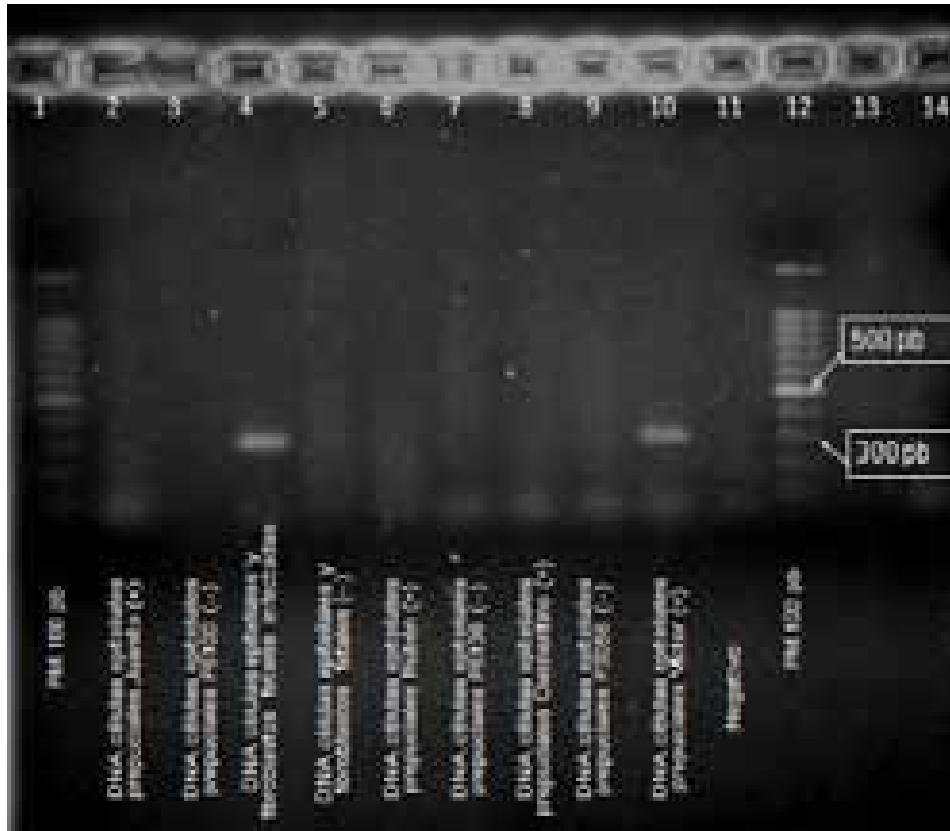


Figura 15. Amplificados del virus de AEC a partir de DNA de células epiteliales de los animales seropositivos y seronegativos. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5%, $MgCl_2$ 1.5mM.

En los carriles 4 y 10 se observan amplificados de 297pb. El carril 4 corresponde a una muestra de ADN de un cultivo de células epiteliales prepuciales y fibroblastos infectados artificialmente con el virus de AEC en feto ovino y el carril 10 corresponde al ADN de células epiteliales prepuciales de un animal seropositivo al virus de AEC.

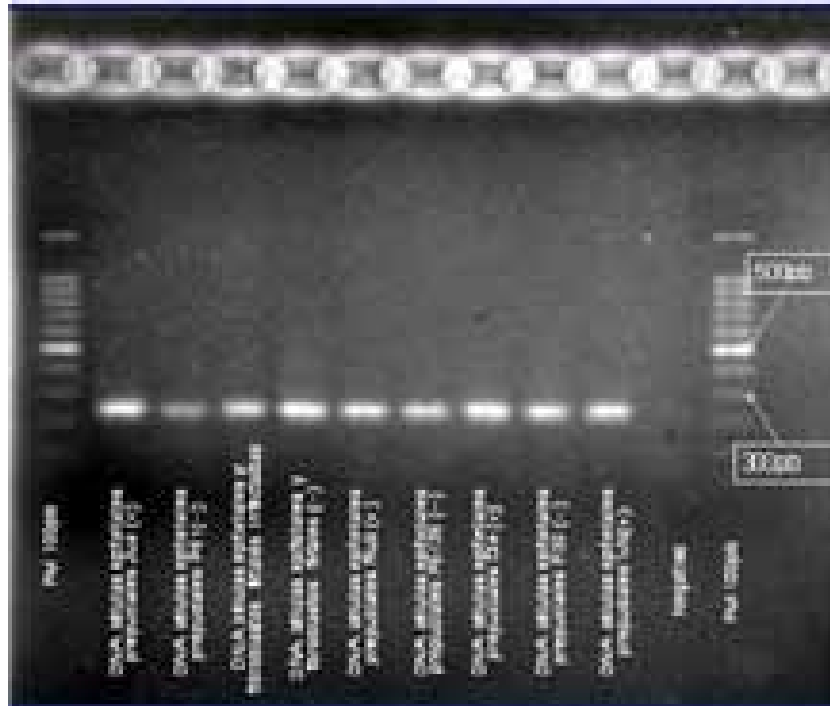


Figura 16. Amplificados de los HPRT de los animales muestreados. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5%, 1.5mM MgCl₂.

En los carriles 2 al 10 se observan amplificados de 229pb del gen constitutivo de HPRT en todas las muestras, lo que indica que el ADN es funcional y las muestras de los geles anteriores que no amplificaron, se atribuyen a que no había virus o no había en cantidad suficiente del provirus de AEC.

5. Discusión

Los cultivos de células fetales de testículo (Dahlberg *et al.*, 1981), cornea de corderos (Kirkland y Batty, 1987; Simard *et al.*, 2001), células de membrana sinovial (Anderson y Cheevers, 1981) y explantes de pulmón (Ellis *et al.*, 1987), se han usado por diversos investigadores para el crecimiento y proliferación del virus de AEC (Crawford *et al.*, 1980; Belov y Walley, 1988; Fieni *et al.*, 2003). En este estudio se demostró que el cultivo celular de células prepuciales puede ser permisivo al virus de AEC, y en el se puede replicar en 21 días promedio.

En los cultivos de prepucio de fetos ovinos y caprinos utilizados en este trabajo, se observó que el tipo de células que se multiplicaban eran fibroblastos y células epiteliales. Se observaron los cultivos hasta los 21 días, para establecer si el virus de AEC producía efecto citopático, aun conociendo que el virus requiere de tiempo para evidenciar su presencia en las células (Narayan *et al.*, 1980). Otro lentivirus como el virus de maedi-visna crece más rápido y causa lisis en fibroblastos, sin embargo el virus de AEC solamente causa una infección no productiva, no citopática, en estas células (Narayan *et al.*, 1980).

Hay datos de que el virus de AEC causa infección en fibroblastos, el genoma del virus de AEC se mantiene intacto, pero el virus de AEC no produce efectos citopáticos aparentes (Chebloune *et al.*, 1996). No hay ningún reporte de actividad del vAEC en cultivos celulares de epitelios prepuciales en rumiantes y mucho menos en cabras.

Se utilizaron dos medios de cultivo para que las células epiteliales prepuciales crecieran con buena confluencia, el MEM y el de Glasgow. Se observó que las células crecían más rápidamente y mantenían mejor morfología con el medio de Glasgow, adicionado con 10% de suero fetal bovino y antibiótico (figura 5). Y se logró una confluencia en el cultivo celular de un 70% en 15 días.

La diferencia entre los dos tipos de medios de cultivo que se usaron es que el medio de Glasgow contiene 4.5 g/LI de glucosa, 0.1078 g/LI de NaH_2PO_4 , 0.0001g/LI de $\text{Fe}(\text{NO}_3)_2 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$, 0.002 - 0.0036 g/LI de vitaminas y no contiene Na_2HPO_4 , lo que sugiere que estos compuestos son requeridos en mayor concentración por este tipo de células epiteliales.

A partir de explantes de tejido prepucial se obtuvieron cultivos celulares fetales. Y de lavados prepuciales de animales adultos, con el uso del desinfectante (estericida), solución de Hank's y antibiótico, se lograron establecer monoestratos, lo que no ha sido reportado en la literatura.

Para los cultivos de lavados prepuciales, también se usó el medio de Glasgow con 10% de suero fetal bovino y antibiótico. En estos cultivos, se observó que una gran cantidad de células epiteliales se eliminaban por desprendimiento después de 16 días. Esto sugiere trabajar este tipo de células antes de 14 días (figura 6), para tener una mayor cantidad y confluencia celular, sin detritus, que podrían interferir con las técnicas de inmunocitoquímica (Lerondelle *et al.*, 1999).

Las células epiteliales de la zona genital están contaminadas por flora microbiana local, además de sustancias químicas y contaminantes externos, sin embargo no se observó ningún tipo de cambio en la morfología y metabolismo celular, durante los 15 días que en que se mantuvieron los monoestratos, por el procedimiento de limpieza y desinfección realizado.

Pensando en el metabolismo acelerado y la vida promedio que tienen las células epiteliales, se varió la concentración de suero fetal bovino en los medios de cultivo, para tratar de mantenerlas por más tiempo, se bajó la cantidad de suero fetal bovino pensando disminuir el metabolismo celular y se observó que las células se seguían eliminando de igual manera que con 10 % de suero fetal. Lo anterior sugiere que las células epiteliales en descamación siguen el comportamiento de desprendimiento y eliminación marcado por los procesos de apoptosis del animal vivo, en el medio de cultivo celular.

En los frotis teñidos con Papanicolaou, la morfología celular de las células prepuciales caprinas (figura 7), presentó los mismos patrones descritos en el humano (Atlas de citología cervico-vaginal).

Al no observarse ningún cambio morfológico en los tipos de células epiteliales prepuciales de los animales seropositivos, en comparación con los seronegativos, a la enfermedad, se sugiere que el virus no modifica la actividad de estas células pese a que si se encontró como provirus.

Se han propuesto como reservorios del virus a las células de la médula ósea (Gendelman *et al.*, 1985; Grossi *et al.*, 2005), células dendríticas foliculares del tejido linfoide (Haase, 1986). En el caso del virus de AEC se ha propuesto que las células epiteliales actúan como reservorio (Lerondelle *et al.*, 1999), igualmente, las células epiteliales presentes en la leche caprina son altamente permisivas para la infección productiva del vAEC y estas células juegan un papel importante en la transmisión del virus (Mselli-Lakhal *et al.*, 1999).

Para establecer la importancia que pueden tener las células epiteliales del prepucio en la transmisión del virus de AEC, sería importante establecer el efecto infectante del virus, mediante co-cultivos con células de la membrana sinovial.

En el VIH las células epiteliales pueden jugar un papel importante en la infección, se propone que transportarían virus y lo transmitirían subsecuentemente al tejido linfocitario (Chou *et al.*, 2000; Weissman *et al.*, 1995). Hay trabajos en humanos que demuestran que las células epiteliales, particularmente líneas celulares endometriales, cervicales, vaginales y de colon, pueden ser infectadas con el virus de IH *in vitro* (Asmuth *et al.*, 1994; Howell *et al.*, 1997; Yahi *et al.*, 1992). En este estudio se demostró la habilidad del virus de AEC, de infectar las células prepuciales que tienen la capacidad de albergar al virus y/o quizás transportarlo.

En el caso del retrovirus humano las células epiteliales no tienen los mismos receptores que las células CD4, pero producen un compuesto llamado galactosilceramida (GalC) que actúa como receptor para que el VIH pueda penetrar la célula epitelial. Sería interesante determinar si las células epiteliales del prepucio producen galactosilceramida, para que el virus de AEC puede penetrar a la célula o si expresan algún co-receptor, como en el caso del VIH (Delezay *et al.*, 1997).

En un trabajo realizado en cabras lecheras, Sánchez *et al.*, 2001, demostraron que los conteos de células somáticas de la leche de cabras seronegativas al virus de AEC, fueron significativamente más bajos que en cabras seropositivas, pero la diferencia no fue significativa con cabras con infección persistente. Los conteos realizados de este trabajo en prepucio caprino de animales seropositivos comparado con los de los seronegativos, no demostraron diferencias a nivel morfológico, ni en el número, con respecto al tipo de célula estudiada. Los tipos de células epiteliales: basales, parabasales, intermedias y superficiales, no presentaron diferencias significativas entre los animales seropositivos y los seronegativos, tampoco se observaron diferencias con respecto al tipo de células leucocitarias: granulocitos, linfocitos, monocito/macrófago, lo que supone que el tiempo y forma en que se tomó la muestra, la persona que la tomó, la hora, el estado nutricional del animal, la edad de los animales y el empadre son unas variantes que se tienen que cuidar para que los resultados puedan tener significancia estadística. Sería importante hacer conteos, cuidando todas las variables posibles, para poder tener resultados con un índice de confiabilidad superior al que se reporta en este trabajo.

Se ha demostrado que el virus de AEC se puede eliminar por semen (Travassos *et al.*, 1998). Además se sabe que los virus que se eliminan por semen, como en el caso del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), la cantidad de partículas virales que se puede detectar son mínimas (Van Voorhis *et al.*, 1991), es por ello que en el presente estudio los resultados positivos obtenidos en las muestras celulares pueden ser significativos.

Miller y colaboradores en 1994, usaron 13 simios (*Macacus Rhesus*) infectados con virus de inmunodeficiencia del simio (vIS) y mediante las técnicas de inmunohistoquímica e hibridación *in situ*, identificaron la presencia del virus, encontrando células infectadas con el vIS a todo nivel del tracto reproductor de los monos, además encontraron el virus infectante en células del epitelio prepucial, pero sin diferenciar los diferentes tipos de células existentes (basales, parabasales, intermedias y superficiales), como se realizó en este estudio.

Gelmetti *et al.*, 2000, utilizó la técnica de inmunohistoquímica, utilizando tres diferentes anticuerpos monoclonales para la detección de antígenos del virus de MV, el de p15, p27 y la p105 en pulmones, obtuvieron un buen marcaje con los anticuerpos monoclonales anti-p27 en los epitelios bronco-alveolares de ovinos infectados experimentalmente. Rosati *et al.*, 1999, sugieren que la p25 es la proteína de efecto cruzado entre el virus de MV y el virus de AEC y es considerada un antígeno inmunodominante en las infecciones causadas por lentivirus. El uso de anticuerpos monoclonales anti-p25, anti-p27 ó anti-p28 resulta similar, porque son proteínas de nucleocápside altamente conservadas. En el presente trabajo se utilizaron anticuerpos monoclonales anti-p28, los cuales detectan antígenos tanto de AEC como de MV. La proteína p28 es un antígeno que se detecta por largo tiempo en los animales infectados, por lo cual se usa en el diagnóstico de MV y AEC.

Con respecto a la técnica de inmunocitoquímica en los cultivos prepuciales de fetos caprinos y ovinos, el saber que pueden ser permisivas al virus es importante, para tomarlos como cultivos opcionales en la producción de virus y antígeno. Los resultados de inmunocitoquímica en los fibroblastos y las células epiteliales que crecieron en los cultivos celulares infectados demostraron el antígeno viral (p28), lo que indica que este tipo de células pueden albergar al virus y quizás replicarlo (Chebloune *et al.*, 1996) (figura 8).

En células epiteliales de lavados prepuciales de animales seropositivos se detectó la presencia del antígeno viral en los diversos tipos morfológicos, lo que indicaría que este tipo de célula puede albergar y ser permisiva al virus de AEC en

animales naturalmente infectados (figuras 11-12), Fantini *et al.*, 1993 y Howell *et al.*, 1997, demostraron que el virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1), puede afectar células epiteliales, aunque trabajaron con células epiteliales del aparato gastro-intestinal, genitourinario y ano-rectal.

Zink *et al.*, 1990, demostraron que en muchos tipos de células, incluidas las epiteliales de diferentes órganos, se localiza el genoma viral de AEC *in vivo*.

En la técnica utilizada para los cultivos celulares como en los lavados prepuciales se hicieron ajustes en cuestión de tiempos de bloqueo con los reactivos: peróxido (15 minutos) y suero fetal caprino negativo (1 hora). El uso del suero fetal caprino negativo a virus de AEC, permitió eliminar la inespecificidad observada en los frotis elaborados con las células epiteliales, que no se podía bloquear en su totalidad con suero de cerdo.

La presencia del antígeno viral en las células epiteliales del prepucio de caprinos seropositivos indica que estas células también sirven como reservorio del virus de AEC y que el virus puede acumularse y eliminarse a través de esta vía, usando a las células superficiales e intermedias. Como en otros lentivirus se sugiere que las células epiteliales prepuciales pueden jugar un papel importante en la excreción del virus por la vía sexual, aunque hay que seguir investigando esta vía como posible mecanismo de transmisión de la enfermedad.

De la Concha-Bermejillo *et al.*, 1996, realizaron un estudio en el cual detectaron anticuerpos por inmunodifusión en agar y el genoma viral del MV por PCR, en el semen de borregos infectados experimentalmente con el virus y con *Brucella ovis*, atrajo células leucocitarias al epidídimo para producir una epididimitis y, solo así se logró obtener virus en el semen. Preziuso *et al.*, 2003, en un estudio similar, infectaron carneros con el virus de MV y con *Brucella bovis* y encontraron virus en células intersticiales y epiteliales del epidídimo y sugieren que la presencia del virus en semen puede ser debida a la excreción del mismo por las células epiteliales del epidídimo. En el presente estudio se sugiere que no solamente el virus se puede excretar por las células epiteliales del epidídimo, sino también por las células epiteliales del prepucio. En este estudio la presencia del lentivirus en prepucio no se asoció a epididimitis u otra patología genital.

Travassos *et al.*, 1998, sugieren la presencia del virus en semen asociada a las células espermáticas y células no espermáticas, sin diferenciar las células epiteliales como lo realizado en este estudio. Por otro lado Cruz *et al.*, 2006 al infectar *in vitro* espermatozoides con virus de AEC, observó al microscopio

electrónico la presencia de una estructura semejante a la partícula desnuda del virus de AEC.

Grossi *et al.*, 2005, demostraron con la técnica de inmunocitoquímica, el virus de AEC en macrófagos de médula ósea y células fibroblásticas de animales infectados, lo que en el presente trabajo se confirmó al encontrarlo en células fibroblásticas de prepucio de feto caprino y ovino y en lavados de células epiteliales de prepucio caprino seropositivo.

Se realizaron conteos de células epiteliales prepuciales que tenían marcaje por la técnica de inmunocitoquímica.

En el cuadro 5 se pueden observar dos animales seropositivos, los cuales fueron inoculados con el virus de referencia y presentan una mayor cantidad de marcaje en comparación con todos los demás animales seropositivos, con esta información se puede decir que en los animales artificialmente infectados, se pueden obtener mejores resultados en los modelos experimentales, en comparación con los animales naturalmente infectados con el virus de AEC, tal como lo sugiere Travassos *et al.*, 1998 y Ali Al *et al.*, 2007.

Al parecer la proporción de células parabasales en los animales infectados artificialmente es mayor que en los animales infectados naturalmente. Sin embargo el análisis estadístico no muestra que esta diferencia sea significativa muy probablemente porque el tamaño de muestra es muy pequeño. (cuadro 5).

La técnica de PCR demostró la presencia del virus de AEC, en forma de provirus, en el genoma de las células epiteliales prepuciales de animales seropositivos y permite demostrar que estas células pueden ser permisivas al virus. Al observar dos amplificadores de 297pb de muestras de DNA de células epiteliales prepuciales de animales seropositivos inoculados experimentalmente y 1 amplificador del mismo virus de 297pb (figuras 13 y 14), se corrobora lo reportado por Konishi *et al.*, 2004, sin embargo este último aisló el virus a partir de sangre de animales infectados. Además en el presente estudio, el virus se obtuvo por semipurificación a partir de sobrenadantes de cultivos celulares de membrana sinovial, obteniéndose buena calidad de ARN viral, confirmándolo por la técnica de RT (control positivo).

El presente estudio utilizó las condiciones propuestas de los iniciadores, gradientes de concentración de $MgCl_2$, temperatura de alineamiento (T_m) de Konishi *et al.*, 2004 con modificaciones mínimas, obteniendo resultados semejantes.

Hay diversos estudios donde trabajaron la técnica de PCR, usando diferentes tipos de iniciadores, para la detección de provirus en los diferentes tipos de muestras trabajadas (Gopal *et al.*, 1993; Lechat *et al.*, 2004; Lamara *et al.*, 2002; Ali Al *et al.*, 2007), los más usados son obtenidos a partir del gen *gag* y del gen *pol* por ser genes muy conservados en los lentivirus, en comparación con el gen *env* que tiende a ser altamente variable.

En este estudio se utilizaron iniciadores pertenecientes al gen *gag* y las muestras trabajadas fueron de cultivos celulares de prepucio de feto ovino y caprino y células epiteliales prepuciales obtenidas por lavados.

Existen otros reportes que usaron muestras de células sanguíneas como los monocitos/macrófagos ó cultivos celulares de membrana sinovial infectados (Gopal *et al.*, 1993) con el fin también de obtener el genoma viral.

Se sabe que existe una alta producción viral en células permisivas como son las células de membrana sinovial en los cultivos *in vitro*. En este estudio también se utilizó esta metodología para la producción de inóculo viral. También se sabe que la replicación de los lentivirus en los tejidos de los animales *in vivo* puede ser altamente focal y no productiva, cosa que pudo suceder con los animales experimentales. Ya que se pueden encontrar pocas células que contengan ADN viral y muchas de éstas producen poco o nada de ARN viral y por consecuencia hay menor traducción de antígenos virales detectables. Además esta restricción parece depender del estado fisiológico y del desarrollo de las células (Guiguen *et al.*, 1990).

En animales infectados de forma subclínica, la replicación del virus en las células es restringida a niveles mínimos de expresión en todos los tejidos y relativamente pocas células son infectadas (Narayan *et al.*, 1977; Pétursson *et al.*, 1976). Así la baja concentración de ADN que se obtuvo de las células prepuciales, permite pensar que al ser células en descamación, una gran cantidad de estas (intermedias y superficiales), con núcleo cariopícnótico ó sin núcleo estaban en apoptosis y esto pudo determinar que mucho del ADN fuera disfuncional.

Poco después de la infección de una célula, el virus puede entrar en un estado latente o restringido de replicación (Haase, 1986) y la cantidad de virus tiende a ser muy baja alrededor de 1×10^6 , lo que pudo limitar su demostración.

El haber obtenido amplificado de dos animales seropositivos al virus de AEC, infectados experimentalmente, a partir del ADN de las células epiteliales prepuciales, demuestra que solamente se puede detectar el virus en este tipo de

animales en el tracto reproductor, como menciona Ali Al, 2007. En los animales seropositivos naturalmente infectados no se detectó o confirmó la presencia del virus en el eyaculado o en algún otro tejido del tracto genital.

Chebloune *et al.*, 1996, demostraron que el virus de AEC, tiene la capacidad para infectar cultivos de fibroblastos de membrana sinovial de cabras y corderos recién nacidos y que se puede detectar por PCR después de 5 días a 3 semanas post-inoculación. En este trabajo se realizó el mismo procedimiento, al infectar cultivos de fibroblastos de epitelios de prepucio fetal caprino y ovino y se detectó con la técnica de PCR después de 15 días post-inoculación la presencia del virus de AEC.

El amplificado de 297pb de un cultivo celular de prepucio de feto infectado con el virus de referencia arriba citado, indica que las células epiteliales y fibroblásticas que crecieron en los cultivos celulares, también pueden contener al provirus de AEC en su genoma celular (figura 15).

Se corroboró el ADN de células prepuciales para saber si era funcional o no, se usó PCR de un gen constitutivo (hipoxantinafosforibosiltransferasa: HPRT humano) este gen codifica proteínas, que al no estar producen hiperuricemia. Con los resultados obtenidos en este trabajo se constata que el gen está presente en el ADN de las cabras.

Seria importante realizar mediante otra técnica molecular, la detección del provirus en el genoma celular, para esto se sugiere la hibridación *in situ*, esta técnica serviría para eliminar cualquier tipo de variables que puedan estar presentes en los lavados prepuciales o en el eyaculado.

6. Conclusión

1.- Los lavados del prepucio realizados permitieron obtener y conocer los diferentes tipos celulares presentes en ese tejido (Células basales, parabasales, intermedias y superficiales), los cuales al realizarles la tinción de Papanicolaou, se observaron con mejor definición en detalles morfológicos que con otra tinción como la de Hematoxilina-Eosina (H-E).

2.- La inmunocitoquímica permitió detectar el Ag viral en:

a) En los cultivos primarios de prepucio de feto caprino y ovino experimentalmente infectados con el virus de AEC. Se demostró que células epiteliales y fibroblásticas fueron permisivas a la infección

b) Los lavados prepuciales donde se obtuvieron las células epiteliales de tipo parabasales, intermedias y superficiales, se demostró la proteína p28 del virus.

3.- Mediante PCR, se comprobó que las células epiteliales del prepucio caprino sirven como reservorios del virus de la artritis encefalitis caprina en animales naturalmente infectados, se confirmó la presencia de genoma viral (provirus) en las células del prepucio.

4.- Mediante PCR, se comprobó que el ADN de las células prepuciales de caprino, contienen el gen constitutivo HPRT, el cual nos sirvió para constatar la viabilidad del ADN trabajado.

5.- Se cumplieron todos los objetivos particulares al igual que con la hipótesis establecida la cual no se rechaza al confirmar que las células epiteliales del prepucio caprino son permisivas al virus de AEC.

7. Referencias

Adams DS and Crawford TB: A viral arthritis encephalitis syndrome in goats. *Int. Goats and Sheep. Research.* 1980; 1: 168-172.

Adams DS., Klevjer-Anderson P., Carlson JL., McGuire TC and Gorman JR: Transmission and control of caprine arthritis encephalitis virus. *Am.J.Vet.Res.*1983;44:1670-1675.

Adams DS., Oliver RE., Ameghino E., De Martini JC., Verwoerd D., Whouwers DJ., Waghela S., .Gorman JR., Hyllset B., Dawson M., Trigo FC., McGuire TC: Serological evidence of caprine arthritis-encephalitis infection in eleven of fourteen countries tested. *Vet.Rec.*1984;115:493-495.

Adeyemo O., Gao RJ and Lan HC: Cytokine production in vitro by macrophages of goats with caprine arthritis-encephalitis. *Cell. Mol. Biol.* 1997; 43: 1031-1037.

Alexandra Fluri., Chiara Nenci., Marie-Luise Zahno., Hans-Rudolf Vogt., Shiv Charan., Andre Busato., Gianfranco Pancino., Ernst Peterhans., Gabriela Obexer-Ruff., Giuseppe Bertoni: The MHC- haplotype influences primary, but not memory, immune responses to an immunodominant peptide containing T-and B-cell epitopes of the caprine arthritis encephalitis virus Gag protein. *Vaccine* 24 (2006): 597-606.

Ali Al Ahmad M.Z., Fieni F., Pellerin JL., Guiguen F., Cherel Y., Chatagnon G., Bouzar AB., Chebloune Y: Detection of viral genome of caprine arthritis encephalitis virus (CAEV) in semen and in genital tract tissues of male goat. *Theriogenology.* 2007. doi: 10.1016/J.theriogenology. 2007. 10.017.

Ali O A: Caprine arthritis-encephalitis related changes in the uterus of goats. *Vet.Rec.*1987:121-131.

Alkan F., Tan MT: A comparative study on the diagnosis of maedi-visna infection in serum and colostrums samples using agar gel immunodiffusion (AGID) technique. *Deut Tierarztl Woch.* 1998; 105: 276-278.

Amorena B., Monleon 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.

Amerighno E., Rivera H., Rosadio R., De Martini J: La artritis encefalitis caprina viral (AECV) en el Perú. Estudio clínico, serológico, histopatológico y aislamiento. *Rve. Latamer. Peq Rumin.* 1993; 1(1): 63-75.

Anderson PK and Cheevers WP: Characterization of the infection of caprine synovial membrane cells by the retrovirus caprine arthritis encephalitis virus. *Virology.* 1981; 110: 113-119.

Archambault D., East N., Perk K., Dahlberg JE: Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for caprine arthritis-encephalitis virus. *J.Clin. Microbiol.* 1988; 26: 971-975.

Asmuth DM., Hammer SM and Wanke CA. Physiological effects of HIV infection on human intestinal epithelial cells: an *in vitro* model for HIV enteropathy. *AIDS* 1994; 8: 205-211.

Atlas de citología cervico-vaginal, <http://quimicosclínicosxalapa04.space.live.com>. ministerio de salud, instituto nacional de salud. Lima. Serie de normas técnicas 43; 2005.

Baba SS., Fontabe Al., Baba MM and Rimstard E: Preliminary survey for antibodies against caprine arthritis-encephalitis virus (CAEV) using recombinant *gag* proteins: studies among small ruminant population in north-eastern Nigeria. *Small Rumin Res.* 2000. 37: 137-140.

Belov B and Whalley M: Virus-specific polypeptides of caprine arthritis-encephalitis virus recognized by monoclonal antibodies to virion proteins p24 and p14. *J. Gen. Virol.* 1988; 69: 1097-1013.

Bertoni G., Zahno ML., Zanoni R., Vogt HR., Peterhans E., Ruff G., Cheevers WP., Sonigo P., Pancino G: Antibody reactivity to the immunodominant epitopes of the caprine arthritis-encephalitis virus gp38 transmembrane protein associates with the development of arthritis. *J. Virol.* 1994; 68: 7139-7147.

Blacklaws BA., Berriatua E., Torsteinsdottir S., Watt NJ., De Andrés D., Klein D., Harkiss GD: Transmission of small ruminant lentiviruses. *Vet Microbiol.* 2004; 101: 199-208.

Bomsel M: Transcytosis of infectious human immunodeficiency virus across a tight human epithelial cell line barrier *Nat. Med.* 1997; 3: 42-47.

Brodie SJ., Pearson LD., Zink MC., Bickle HM., Anderson BC., Marcom KA., De Martini JC: Ovine lentivirus expression and disease. Virus replication, but not entry, is restricted to macrophages of specific tissues. *Am. J. Pathol.* 1985; 146: 250-263.

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

Buendía AJ., Morales YN., Martínez RHA: Detección de p28 del virus de artritis encefalitis caprina en cotiledones de cabras alpinas. Memorias. Reunión anual de caprinocultura. *A.C. Culiacán Sin. México.* Octubre de 2005.

Cann A: *Molecular Virology.* 2ed *Academic Press San Diego,* 1997; 5: 128-260.

Carroza ML., Mazzei M., Bandecchi P., Arispici M., Tolari F: *In situ* PCR-associated immunohistochemistry identifies cell types harbouring the maedi-visna virus genome in tissue sections of sheep infected naturally. *J. Virol. Methods.* 2003; 107: 121-127.

Celer VJ., Nemcova H., Celer V: Isolation and partial characterization of ovine lentivirus in Czech Republic. *Folia Microbiol. (Praha).* 1997; 42: 395-399.

Chebloune Y., Sheffer D., Karr BM., Stephens E and Narayan O: Restrictive type of replication of ovine/caprine lentiviruses in ovine fibroblast cell culture. *Virology.* 1996; 222: 21-30.

Cheevers WP., Roberson S., Kleujer-Anderson P and Crawford TB: Characterization of caprine arthritis – encephalitis virus a retrovirus of goat. *Archives of Virology.* 1981; 67: 111-117.

Chi D., Henry J., Kelley J., Thorpe R., Smith JK., Krishnas-Warny G: The effects of HIV infection in endothelial functions. *Endothelium.* 2000; 7: 223-242.

Chou LL., Epstein J., Cassol SA., West DM and Firth JD: Oral mucosal Langerhans cells as target, effector and vector in HIV infection. *J. Oral. Pathol. Med.* 2000; 29: 394-402.

Clavijo A. and Thorsen J: Chemiluminescent detection of caprine arthritis encephalitis virus with a PCR-generated single stranded nonradiolabelled probe. *Vet. Microb.* 1996b; 43: 295-305.

Clements JE., D'Antonio N and Narayan O: Genomic changes associated with antigenic variation of maedi-visna II. Common nucleotides changes detected in variants from independent isolations. *J. Mol. Biol.* 1982; 158: 415-434.

Clements JE., Zink MC: Molecular biology and pathogenesis of animal lentivirus infections. *Clin. Microbiol. Rev.* 1996; 9 (1): 100-117.

Coffin JM: *Retroviridae*. The viruses and their replication, in: B.N.Fields, D.N. Knipe P.M., Howley (Eds.), Lippincot-Raven Publishers, Philadelphia. 1996: 1767-1835.

Cohen OJ and Fauci AS: Pathogenesis and medical aspects of HIV-1 infection. In Knipe D.M., Howley P.M., eds. *Fields Virology*. 4 ed. Philadelphia, Lippincott Williams and Wilkins. 2001: 2043-2094.

Cohn BA. In search of human skin pheromones. *Arch Derm.* 1994; 130: 1048-1051.

Cork LC., Hadlow WJ., Crawford TB., Gorham TR and Piper RC: Infectious Leukoencephalomyelitis of young goats. *J. Inf. Dis.* 1974; 129: 134-141.

Crawford TB., Adams DS., Cheevers WD and Cork LC: Chronic arthritis in goats caused by a retrovirus. *Science.* 1980; 207: 997-999.

Crawford TB and Adams DS: Caprine arthritis encephalitis: Clinical features and presence of antibody in selected goat populations. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1981; 178 (7): 713-719.

Cruz Ramírez Sandra Irma. Análisis inmunocitoquímico de semen proveniente de machos caprinos infectados con artritis encefalitis caprina (AEC). Tesis de licenciatura 2006. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. Unam.

Cutlip RC., Lehmkuhl HD., Whipp SC., Mc. Clurkin AW: Effects on ovine fetus of exposure to ovine progressive pneumonia virus. *Am. J. Vet. Res.* 1982; 43: 82-85.

Cutlip RC., Jackson TA., Laird GA: Immunodifusion Test for ovine Progressive Pneumonia. *Am. J. Vet. Res.* 1977; 38: 1081-1084.

Dahlberg JE., Gasking JM and Perk K: Morphological and immunological comparison of caprine arthritis encephalitis and ovine progressive pneumonia virus. *J. Virol.* 1981: 914-919.

Daltabuit MT., De la Concha-Bermejillo LEL., Loza RE and Aguilar SA: Isolation of

caprine arthritis encephalitis virus from goats in Mexico. *Can. J. Vet. Res.* 1999; 3: 212-215.

Dawson M: Lentivirus diseases of domesticated animals. *J. Comp. Pathol.* 1988; 99: 401-419.

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

Desrosiers RC: Nonhuman lentiviruses. En Knipe D.M., Howley P.M. eds. *Fields Virology*, 4 ed. Philadelphia, Lippincott Williams and Wilkins. 2001: 2095-2121.

Delezay O., Koch N., Yahi N., Hammache D., Tourres C., Tamalet C and Fantini J. Co-expression of CXCR4/fusin and galactosylceramide in the human intestinal epithelial cell line HT-29. *AIDS.* 1997; 11; 1311-1318.

Diario oficial de la Federación de la Federación México. 2007.

Ding EY., Xiang WH: Immune responses in goats to caprine arthritis-encephalitis virus. *Viral. Immunol.* 1997; 10 (2): 111-115.

Dodd RY., Fang CT: The western immunoblot procedure for HIV antibodies and its interpretation. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 1990; 114: 240-245.

East EN., Rowe JD., Dahlberg JE., Theilen GH and Pedersen NC: Modes of transmission of caprine arthritis-encephalitis virus infection. *Small Rumin. Res.* 1993; 10: 251-261.

East EN., Rowe JD., Madewel BR., Floyd K: Serologic prevalence of caprine arthritis-encephalitis virus in California goats dairies. *J. Am. Vet. Assoc.* 1987; 190:182-186.

Ellis TM., Robinson WF and Wilcox GE: Effect of colostrums deprivation of goats kids on the natural transmission of caprine retrovirus infection. *Aust. Vet. J.* 1983; 60:326-329.

Ellis TM., Robinson WF and Wilcox GE: The pathology and etiology of lung lesions in goats infected with caprine arthritis-encephalitis virus. *Aust. Vet. J.* 1983; 60: 326-329.

Ellis TM., Robinson WF., Wilcox GE: The effect of colostrums-derived antibody on neonatal transmission of caprine arthritis encephalitis virus infection. *Aust. Vet. J.* 1988; 63 (8): 242-245.

Embretson J., Zupancic M., Ribas JL., Burke A., Tenner-Rac, K., Haase AT: Massive covert infection of helper T lymphocytes and macrophages by HIV during the incubation period of AIDS. *Nature.* 1993; 362: 359-362.

Eriksson K., Mc Innes E., Ryan S., Tonks P., Mc Connell I., Blacklaws BA: CD4(+) T-cell are required for the establishment of maedi-visna virus infection in macrophages but not dendritic cells *in vivo*. *Virology.* 1999; 258 (2): 355-364.

Fantini J., Cook DG., Nathanson N., Spitalnik SL., Gonzalez-Scarano F: Infection of colonic epithelial cell lines by type 1 human immunodeficiency virus is associated with cell surface expression of galactosylceramide, a potential alternative gp 120 receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1993; 2700-2704.

Fieni F., Rowe J., Van Hoosear K., Burucoa C., Oppenheim S., Anderson G., Murray J., Bon Durant R (a): Presence of caprine arthritis encephalitis (CAE) infected cells in flushing media following oviductal-stage embryo collection. *Theriogenology.*2003;57:931-940.

Garfias Y., Linares M., Suarez R., Sánchez-Navarro A., Jiménez-Martínez MC: Características inmunológicas de las células epiteliales limbares: análisis *in vitro* de la función del TLR4. *Arch. Soc. Esp. Oftalmol.* 2007; 82: 95-102.

Gay G., Valdivieso N., Tron F., Enríquez 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.

Gelmetti D., Gibelli L., Brocchi E., Cammarata G: Using a panel of monoclonal antibodies to detect Maedi virus (MV) in chronic pulmonary distress of sheep. *J. Virol.* 2000: 88; 9-14.

Genbank. www.ncbi.nih.gov/sites/entrez. Genome for CAEV.

Gendelman HE., Narayan O., Kennedy-Stoskopf S., Kennedy PGE., Ghotbi Z., Clements JE., Stanley F., Pezeshkpour G: Tropism of Sheep lentivirus for

monocytes: susceptibility to infection and virus gene expression increase during maturation of monocytes and macrophages. *J. Virol.* 1986; 58: 67-74.

Gendelman HE., Narayan O., Molineaux S: Show persistent replication of lentiviruses: Role of tissue macrophages and macrophage precursors in bone marrow. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1985; 82: 7086-7090.

Georgsson G., Pétursson G., Miller A., Nathanson N., Pálsson PA: Experimental visna in foetal Icelandic sheep. *J. Comp. Pathol.* 1978; 88: 597-605.

Grewal A., Greenwood PE., Burton RW., Smith JE., Batty EM and North R: Caprine retrovirus infection in New South Wales: Virus Isolation, clinical and histopatological finding and prevalence of antibodies. *Aust. Vet. J.* 1986; 63: 245-248.

Grossi P., Giudice C., Bertolotti I., Cioccarelli G., Brocchi 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. Pathol.* 2005; 133: 197-200.

Gogolewski RP., Scott AD., McGuire TC., Banks KL., Cheevers WP: Antigenic cross reactivity between caprine arthritis-encephalitis – Visna and progressive Pneunonia viruses involves all viri3n-associated proteins and glycoproteins. *J. Gen. Virol.* 1985; 66: 1233-1240.

Gopal PR., Walter JS and Walid H: Detection of caprine arthritis encephalitis virus by polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* 1993; 3042-3043.

Guiguen F., Lerondelle C., Favier C : Réponses du chevreau à des monocytes infectés in vitro par le virus de L'arthrite et de l'encéphalite de la chevrè. *Ann. Rech. Vet.* 1990; 21: 179-185.

Guiguen F., Mselli-Lakhal 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: 456-61.

Haase AT: Pathogenesis of lentivirus infections. *Nature.* 1986; 332: 130-136.
Harmache A., Russo P., Guiguen F., Vitu C., Vignoni M., Bouyac M., Hieblot C., Pepin M., Vigne R., Suzan M: Requirement of caprine arthritis-encephalitis virus *vif* gene for *in vivo* replication. *Virology.* 1996; 224: 246-255.

Harmache A., Vitu C., Russo P., Bouyac M., Hieblot C., Peveri P., Suzan M: The caprine arthritis-encephalitis virus tat gene is dispensable for efficient viral replication in vitro and in vivo. *J. Virol.* 1995; 69: 5445-5454.

Heckert RA., McNab WB., Rivhardson SM., Briscoe MR: Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of antibodies to caprine arthritis-encephalitis virus in goats serum. *Can. J. Vet. Res.* 1992; 56: 237-241.

Houwens DI and Nauta JM: Immunoblot analysis of the antibody response to ovine lentivirus infection. *Vet. Microbiol.* 1989; 19: 127-139.

Howell AL., Edkins RD., Rier .E., Yeaman GR., Stern JE., Fanger MW., Wira CR: Human immunodeficiency virus type 1 infection of cells and tissues from the upper and lower human female reproductive tract. *J. Virol.* 1997; 71: 3498-3506.

http://es.wikipedia.org/wiki/C%C3%A9lula_epitelial

Huso DL., Narayan O., Hart GW: Sialic acids on the surface of caprine arthritis-encephalitis virus define the biological properties of the virus. *J. Virol.* 1988; 62: 1974-1980.

Hyslop NSTG and Fagg RH: Isolation of variants during passage of a strain of foot and mouth disease virus in partly immunized cattle. *Journal of Hygiene.* 1965; 63: 357-368.

International Classification Taxonomy Viruses (ICTV)
www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/ICTVdB.

Jackson K., Knowles DP., Stem TA., Robinson WG., Cheevers WP: Genetic structure of the *pol-env* region of the caprine arthritis-encephalitis lentivirus genome. *Virology.* 1991; 180: 389-394.

Jan CL., Greenland T., Gounerl F., Balleydier S., Mornex JF: Activation of small ruminant aortic endothelial cell after in vitro infection by caprine arthritis encephalitis virus. *Res. Vet. Sci.* 2000; 69 (3): 225-231.

Jordan HL., Liang Y., Hudson LC and Tompkins WA: Shedding of feline immunodeficiency virus in semen of domestic cats during acute infection. *Am. J. Vet. Res.* 1999; 60: 211-215.

Keenan FK: Goat diseases: caprine retrovirus DPI note, Department of Primary industries Queensland Disponivelem(:www.dpi.qld.gov.au/dpinotes/animals/goat/aph_99001.html) Acesso em: 23 ago. 1999.

Kennedy-Stoskopf S., Narayan O., Strandberg JD: The mammary gland as a target organ for infection with caprine arthritis encephalitis. *J. Comp. Pathol.* 1985; 95: 609-617.

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

Knowles DP: Laboratory diagnostic tests for retrovirus infection of small ruminants, *Vet. Clin. North. Am. Food Anim. Pract.* 1997; 13: 1-11.

Knowles D., Cheevers W., Mc Guire T., Stem and Gorham J: Severity of arthritis is predicted by antibody response to gp 135 in chronic infection with caprine arthritis-encephalitis virus. *J. Virol.* 1990; 64: 2396-2398.

Konishi M., Tsuduku S., Haritani M., Murakami K., Tsuboi T., Kobayashi Ch., Yoshikawa K., Kimura KM., Sentsui H. An Epidemic of Caprine Arthritis Encephalitis in Japan: Isolation of the Virus. *Virology. J. Vet. Met. Sci.* 2004; 66(8); 911-917.

Kono Y., Kobayashi K and Fukanaya Y: Antigenic drift of equine infectious anaemia virus in chronically infected horses. *Archiv für die gesamte. Virus for shung.* 1973; 41: 1-10.

Kwang J., Keen J., Cutlip RC., Kim HS., Bermejillo A De La C: 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 Yahia: Efficient replication of caprine arthritis-encephalitis virus in goats granulosa cells. *Vir. Res.* 2001; 79: 165-172.

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

Laver WG and Webster RG: Selection of antigenic mutants of influenza viruses. Isolation and peptide mapping of their hemagglutinating protein. *Virology.* 1968; 34: 193-202.

Lawrence D: Atlas of Diagnostic immunohistopathology, Lawrence D. True (Ed) Gower Medical Publishing a division of J.B.Lippincott Company, *New York*, 1990.

Lechant E., Milhau N., Bellaton C., Greenland T., Mornex JF and Le Jan C: Goat endothelial cells may be infected *in vitro* by transmigration of caprine arthritis-encephalitis virus-infected leucocytes. *Vet. imm. immunop.* 2005; 104: 257-263.

Lechner F., Machado J., Bertoni G., Seow HF., Dobbela DA., Peterhans E: Caprine arthritis-encephalitis virus dysregulates the expression of cytokines in macrophages. *J. Virol.* 1996; 71(10): 7488-7497.

Leis J., Baltimore D., Bishop JM., Coffin J., Fleissner E., Goff SP., Oroszlan S., Robinson H., Skalka AM., Temin HM and Vogt V: Standardized and simplified nomenclature for proteins common to all retroviruses. *J. Virol.* 1988; 62: 1808-1809.

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

Lerondelle C., Fleury C., Vialard J: La glande mammaire : organe cible de l'infection par le virus de l'arthritisme et d'encéphalite caprine. *Ann. Rech. Vet.* 1989 ; 20:57-64.

Lerondelle C., Godet M., Mornex JF: Infection of primary cultures of mammary epithelial cells by small ruminant lentiviruses. *Vet. Res.* 1999 ; 30 : 467-474.

Leroux C., Chastang J., Greenland T., Mornex JF: Genomic heterogeneity of small ruminant lentiviruses: existence of heterogeneous populations in sheep and of the same lentiviral genotypes in sheep and goats. *Arch. Virol.* 1997; 142: 1125-1137.

Leroux C., Lerondelle C., Chastang J and Mornex J F: RT-PCR detection of lentiviruses in milk or mammary secretions of sheep or goats from infected flocks. *Vet. Res.* 1997; 28: 115-121.

Leyva GVH., Martínez RHA., González RMG., Cornejo CMA., Garrido FG., Rojas MML., González PS., Montaraz CJA., Rosales ME: Identificación del virus de la artritis encefalitis caprina mediante el estudio histopatológico, inmunohistoquímico y ultraestructural, en tejidos de cabras seropositivas en México. *Rev. Lat. Amer. Microbiol.* 1998; Vol. 40. Nos. 1 y 2: 1-19.

Lodish H., Berk A., Zipursky SL., Matsudaira P., Baltimore D., Darnell JE: Biología celular y molecular. Editorial Médica Panamericana. Cuarta ed. Madrid España. 2002; p.p. 202-203; 220-221.

Mammano F., Öhagen Á., Höglund S., Göttlinger HG: Role of the major homology region of human immunodeficiency virus type 1 in virión morphogenesis. *J. Virol.* 1994;68:4927-4936.

Martínez RHA., Ramírez H., Tórtora P.J.L., Montaraz CJA: Detection of antibodies in seminal liquid of animals infected with goat arthritis encephalitis by Western blotting. International Conference and Workshop on Animals Retroviruses. 3-6 September 2000. Cambridge. UK.

Martínez RHA: Diseminación del virus de artritis encefalitis caprina (AEC) a partir de machos caprinos infectados experimentalmente y su efecto en el aparato reproductor. Tesis de Doctor en Ciencias. 2003. FMVZ- FES-C. UNAM.

Martínez RHA., Ramírez ÁH., Tórtora P.J., Aguilar SÁ, Garrido FGI., Montaraz CJA: Efecto del virus de artritis encefalitis caprina en el aparato reproductor de machos caprinos. *Vet. Mex.* 2005; 36 (2): 159-282.

Matthews JG : Diseases of the goat 2da. Edition. Blackwell *Science* ; 1999 : 80-86.

Mc Guire TC., Adams DS., Johnson GC., Anderson PK., Barbee DD., Gorhm JR : Acute arthritis in caprine - encephalitis virus challenges exposure of vaccinated or persistently infected goats. *Am. J. Vet. Res.* 1986; 47: 537-540.
Mc Guire TC : The immune response to viral antigens as a determinant of arthritis in caprine arthritis-encephalitis virus infection. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 1987; 17: 465-470.

Mdurvwa EG., Ogunbiyi PO., Gakou HS., Reddy PG: Pathogenic mechanisms of caprine arthritis-encephalitis virus. *Vet. Research. Comm.* 1994; 18: 483-490.

Meric C. and Goff S.P. Characterization of Moloney murine leukemia virus mutants with single-amino-acid substitutions in the Cys-His box of the nucleocapsid protein. *J. Virol.* 1989; 63: 1558-1568.

Miller CJ., Vogel P., Alexander NJ., Dandekar S., Hendrikx AG and Marx PA. Pathology and localization of simian immunodeficiency virus in the reproductive tract of chronically infected male *rhesus macaques*. *Lab Inv.* 1994; 70:255-266.

Mselli-Lakhal L., Guiguen F., Fornazero C., Jian D., Favier C., Durand J., Grezel D., Balleydier S., Mornex JF., Chebloune Y: Goats milk epithelial cells are highly permissive to CAE infection in vitro. *Virology.* 1999; 259: 67-73.

Murphy FA., Gibbs EP., Horzinek MC., Studdert MJ: Veterinary virology. 3era. edition. San Diego (Cal): *Academic Press*, 1999.

Nakamura Y., Kameoka M., Okada Y., Zhong Q., Kimura T., Azuma I: A chain section containing epitopes for cytotoxic T,B and Helper T cells withing a highly conserved región found in the human immunodeficiency virus type 1 *gag* protein. *Vaccine* 1997; 15 (5): 489-496.

Narayan O and Clements JE: Biology and pathogenesis of lentiviruses. *J. Gen. Virol.* 1989; 70: 1617-1639.

Narayan O and Cork L: Caprine arthritis-encephalitis virus. Vol. 3. In: Virus infection of ruminants. New York. USA: *Elsevier Amsterdam*; 1990: 41:441-452.

Narayan O., Clements JE., Strandberg JD., Cork L and Griffin DE: Biological characterization of the virus causing leucoencephalitis and arthritis in goats. *J. Gen. Virol.* 1980; 50: 69-79.

Narayan O., Kennedy-Stoskopf S., Sheffer D., Griffin DE., Clements JE: Activation of caprine arthritis-encephalitis virus expression during maturation of monocytes to macrophages. *Inf. Immun.* 1983; 41(1): 67-73.

Narayan O., Silverstein AM., Price D., Johnson RT: Visna virus infection of America lambs, *Science*. 1974; 183: 1202-1203.

Narayan O., Wolinsky JS., Clements JE., Strandberg JD., Griffin DE and Cork LC: Slow virus replication the role of macrophages in the persistence and expression of visna viruses of sheep and goats. *J. Gen. Virol.* 1982; 59: 345-356.

Narayan O., Zink MC., Borrel M., McEntee M., Sharma D., Adams R: Lentivirus Induced arthritis in animals. *J.Rheumatol.* 1992; 19: 25-32.

Nash JW., Hanson LA., Coats KStC: Bovine immunodeficiency virus in stud bull semen. *Am. J. Vet.Res.* 1995; 56: 760-763.

Nazara S., Trigo FJ., Suberbie E. Madrigal V (a): 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 CS., Trigo FJ., Suberbie E., Madrigal V (b): Estudio serológico de la artritis-encefalitis caprina en México. *Téc. Pec. Mex.* 1985; 48: 98-101.

Nazara CS., Trigo FJ., Suberbie E., Madrigal V (c): Estudio clínico-patológico de la artritis-encefalitis caprina en México. *Rev. Veterinaria Mex.* 1985; 16: 91-96.

Nord K., Rimstad E., Storset K., Loken: Prevalence of antibodies against caprine arthritis-encephalitis virus in goats herds in Norway. *Small Rum. Res.* 1998; 28: 115-121.

Ozel M., Pauli G and Gelderblom H: The organization of the envelope projections on the surface of HIV. *Arch. Virol.* 1988; 100: 255-266.

Pantaleo G., Graziosi C., Demarest J.F., Butini L., Montroni M., Fox C.H., Orenstein J.M., Kotler D.P., Fauci A.S. HIV infection is active and progressive in lymphoid tissue during the clinically latent stage of disease. *Nature.* 1993; 362: 355-358.

Parekh B., Issel C and Montelaro R: Equine infectious anemia virus, a putative lentivirus, contains polypeptides analogous to prototype-C oncornaviruses. *Virology.* 1980; 107: 520-525.

Peluso R., Haase A., Stowring L., Edwards M., Ventura P: A Trojan horse mechanism for the spread of visna virus in monocytes. *Virology.* 1985; 47: 231-236.

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

Peretz G., Asso J., 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 lentivirus in caprine arthritis encephalitis system. *Virology.* 1999; 253: 8-9.

Perry LL., Wilkerson MJ., Hullinger GA., Cheevers WP: Depressed CD4+ T Lymphocyte proliferative response and enhanced antibody response to viral antigen in chronic lentivirus- induced arthritis. *J. Infect. Dis.* 1995; 171: 328-334.

Peterhans E., Zanoni R., Ruff G., Lazary S: Caprine arthritis encephalitis. Verlag Paul Darey Hamburg Berlin. 1990; 147-154.

Peterhans H: Lentivirus of small ruminants CAE and Maedi-Visna virus. CD-ROM Word Vet Congress Vet. Lyon, France, September. 1999; 23-26.

Peterlin BM and Luciw PA: Cellular factors regulate transactivation of human immunodeficiency virus type 1. *AIDS.* 1988; 2: 529-540.

Petursson G., Hoff-Jorgensen R: Developments in veterinary virology "maedi-visna and related diseases", 2 ed. (CA,USA) *Kluwer Academic Publishers*, 1992.

Petursson G., Nathanson N., Georgsson G., Panitch H., Palsson PA: Pathogenesis of visna. I. Sequential virologic serologic and pathologic studies. *Laboratory Investigation*. 1976; 35: 402-412.

Phelps SL and Smith MC: caprine arthritis-encephalitis virus infection. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1993; 203 (12): 1663-1666.

Porter DD: Persistence of viral infection in the presence of immunity. In viral immunology and immunopathology. Edited by A.L. Notking. *New York and London: Academic Press*. 189-200.

Prabir K. Tissue distribution of constitutive and induced soluble peroxidase in rat: purification and characterization from lacrimal gland. *Eur J Biochem* 1992; 206: 59-67.

Pretiuzo S., Sanna E., Sanna MP., Ioddo 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.

Pugh DG: *Sheep and Goat Medicine*. W.B. Saunders Company. Philadelphia. 2002: 126, 239-240, 296, 388.

Putney SD and Montelaro RC: Lentivirus in: Regenmortel; MHV, Neurath A.R., editors. *Immunochemistry of viruses II. The basis for serodiagnosis and vaccines: Science Publishers B.V. Elsevier*; 1990: 307-344.

Pyper JM., Clements JE., Molineaux SM., Narayan O: Genetic variation among lentivirus: homology between visna virus and caprine arthritis-encephalitis virus is confined to the 5' *gag*, *pol* region and a small portion of the *env* gene. *J. Virol.* 1986; 51: 713-721.

Querat G., Barban V., Filippi N., Vigne R., Russo P., Vitu C: Highly lytic and persistent lentivirus naturally present in sheep with progressive pneumonia are genetically distinct. *J. Virol.* 1984; 52: 672-679.

Ramírez Á H: Evaluación in vitro de proteínas antigénicas de un virus de Artritis Encefalitis Caprina (AEC) aislado en México, usando las técnicas de ELISA y Western blot. 2002. FES-C. FMVZ. UNAM.

Ramírez Á H: Utilización de células de membrana sinovial de feto caprino para la producción de antígeno del virus de artritis encefalitis caprina en México.1998. Tesis UNAM. FES.C.

Reddy PG., SAPP WJ., Heneine W: Detection of caprine arthritis-encephalitis virus by polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* 1993; 31: 3042-3043.

Rimstad E., East N., De Rock E., Higgins J and Pedersen NC: Detection of antibodies to caprine arthritis-encephalitis virus using recombinant *gag* proteins. *Arch. Virol.* 1994; 134: 345-356.

Roberson SM., Mc Guire TC., Klevjer-Anderson P., Gorham JR., Cheevers WP: Caprine arthritis – encephalitis virus is distinct from viral and progressive pneumonia viruses as measured by genome sequence homology. *J Virol.* 1982; 44: 755-758.

Robinson W F., Ellis M: Caprine arthritis – encephalitis virus infection from recognition to eradication. *Aust. Vet. J.* 1986; 134: 345-356.

Rolich E, Shaumberg-Lever F, Kissen C. Immunelectron microscopic localization of cathepsin B in human apocrine glands. *J Cutan Pathol* 1993; 20: 54-60.

Rolland M., Chauvineau C., Valas S., Mamout RZ., Perrin G: Establishment and characterization of a goats synovial membrane cell line susceptible to Small Ruminant Lentivirus infection. 2004; 118: 123-130.

Rosati S., Pittau M., Tolari K., Erre G., Kwong J: Genetic and antigenic characterization of CAEV (Caprine arthritis – encephalitis virus) recombinant transmembrane protein. *Vet. Microbiol.* 1995; 45: 363-370.

Rowe JD and 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.

Rowe JD., East N., Franti CE., Thurmond MC., Pedersen NC and Theilen GH: Risk factors associated with incidence of seroconversion to caprine arthritis – encephalitis virus on California dairies. *Am. J. Vet. Res.* 1992; 53: 2396-2403.

Rowe JD: Epidemiology of the CAE: Horizontal transmission of the virus.CD-ROM Word Vet. Congress. Lyon. France. Sept. 1999; 23-26.

Russo P., Vitu C., Fortaine JJ., Vignoni M: Arthritis encephalitis caprine: Essai D'une preparation vaccinale adjuvee-II. Etude Clinique et virologique. *Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis.* 1993; 16(2): 131-136.

Ryan S., Tiley L., McConnell I., Blacklaws B: Infection of dendritic cells by the Maedi-visna lentivirus. *J. Virol.* 2000; 74: 10096-10103.

Saltarelli M., Querat G., Konings D., Vigner R., Clements JE: Nucleotide sequence and transcriptional analysis of molecular clones of CAEV which generate infectious virus. *Virology.* 1990; 179: 347-364.

Sanchez A., Contreras A., Corrales JC., Marco JC: Relationships between infection with caprine arthritis encephalitis in dairy goats. *Vet. Rec.* 2001; 148 (23): 711-714.

Sánchez-Vizcaíno JM, Cambra AM. Técnicas inmunoenzimáticas ELISA en patología animal y vegetal. Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias, Office International des Epizooties, Serie Técnica No. 7 1987.

Saunders M: Arthrite encéphalite caprine á virus: aspects épidémiologiques et importance en production caprine. *Point. Vet.* 1998; 29 (194): 829-837.

Schroeder BA., Oliver RE., Cathcart A: The development and evaluation of an ELISA for the detection of antibodies to caprine arthritis- encephalitis virus in goat sera. *NZ. Vet. J.* 1985; 33: 213-215.

Scott JV., Storwring L., Haase AT., Narayan O., Vigne R: Antigenic variation in maedi-visna virus. *Cell.* 1979; 18: 321-327.

Seroude V., Audoly G., Gluschankof and Suzan M: Viral and cellular Specificities of caprine arthritis encephalitis virus *vif* protein. *Virology.* 2002; 292: 156-161.

Shah C., Huder JB., Böni J., Huder BJ., Vogt Hans-Rudolf., Mühlherr J., Zanoni R., Miserez R., Lutz H and Schüpbach: Phylogenetic analysis and reclassification of caprine and ovine lentiviruses based on 104 new isolation: evidence for regular sheep-to-goat transmission and worldwide propagation through livestock trade. *Virology.* 2004 (b): 12-26.

Shah C., Huder JB., Böni J., Schonmann., Mühlherr J., Lutz H and Schüpbach: Direct evidence for natural transmission of small-ruminant lentiviruses of subtype A4 from goats to sheep and viceversa. *Journal of Virology.* 2004 (a): 7518-7522.

Sigurdsson B: Maedi a slow progressive pneumonia of sheep: an epizootological and a pathological study. *Br. Vet. J.* 1954; 110: 255-270.

Sigurdsson B., Thormar H., Palsson PA: Cultivation of visna virus in tissue culture. *Arch. Ges. Virusforsch.* 1960; 10: 368-381.

Siman E., Van Eynde G., Lujtan L., Extramiana B., Harkiss G., Tolari F., González L., Amorena B., Watt N., Badiola J: A new sensitive serological assay for detection of lentivirus infection in small ruminants. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 1999; 6 (5): 734-740.

Simard C, Kibenge 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 (2): 352-356.

Smith MC and Cutlip R: Effects of infection with caprine arthritis encephalitis virus on milk production in goats. *JAVMA.* 1988; 193 (1): 63.67.

Smith MC and Sherman DM: Goat Medicine.1994 Lea & Febiger. USA.
Souderyns H., Pantaleo G: The moving target: mechanisms of HIV persistence during primary infection. *Immunol. Today.* 1999; 20 (10): 446-450.

Souriou L: Diagnostic serologiques de l'ainfection par le CAEV chez les chevrettes comparaison de trois techniques : immuno-diffusion en gelosa, Elisa et Western-Blot. These de Doctorat Veterinaire, Ecole Nationale Veterinaire.Lyon. France. 1998.

Tesoro CE: Estudio de relaciones inmunológicas entre el virus de arthritis encephalitis caprina (VAEC) y el virus de inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1) (Tesis de maestría). México (D.F.). Facultad de Ciencias. UNAM. 2001.

Toniolo A., Serra C., Conaldi PG., Basolo F., Falcone V., Dolei A: Productive HIV - 1 infection of normal human mammary epithelial cells *AIDS* 1995; 9: 859-866.

Travassos CE., Benoit C., Valas S., Da Sila AG and Perrin G: Caprine arthritis-encephalitis virus in semen of naturally infected bucks. *Small Rumin. Res.* 1998; 32: 101-106.

Travassos C., Benoit C., Valas S., Da Silva A and Perrin G: Détection du virus de l'arthritis encéfalite caprine dans le sperma de boucs infectés expérimentalement. *Vet. Res.*1998; 29 (6): 579-584.

Trevor MC., Graham EW., Wayne FR: Antigenic Variation of Caprine Arthritis-Encephalitis virus during persistent Infection of goats. *J. gen. Virol.* 1987; 68:3145-3152.

Turin L., Pisoni G., Giannino ML., Antonini M., Rosati S., Ruffo G., Moroni P: Correlation between milk parameters in CAEV seropositive and negative primiparous goats during and eradication program in Italian farm. *Small Ruminant Research.* 2005; 57: 73-79.

Van-Voorhis BJ., Martinez A., Mayer K and Anderson DJ: Detection of Human immunodeficiency virus type 1 in semen from seropositive men using culture and polymerase chain reaction deoxyribonucleic acid amplification techniques. *Fertility and sterility.* 1991. 55; 3: 588-594.

Vitu C and Russo P: L'arthrite-encephalite enzootique caprine en France: Recherches epidemiologiques et experimentales. *Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis.* 1993; 16 (2): 137-144.

Weissman D., Li Y., Ananworanich J., Zhou LJ., Adelsberger J., Tedder RF., Baseler M and Fauci AS: Three populations of cells with dendritic morphology exist in peripheral blood, only one of which is infectable with human immunodeficiency virus type 1. *Proc. Natl. Acad Sci USA.* 1995; 92: 826-830.

Werling D., Langhans W., Geary N: Caprine arthritis encephalitis virus infection changes caprine blood monocyte responsiveness to lipopolysaccharide stimulation *in vitro.* *Vet. Immunol. Immunopathol.* 1994; 43: 401-411.

Wilkerson MJ., Davis WC., Baszler TV., Cheevers WP: Immunopathology of chronic lentivirus induced arthritis. *Am. J. Pathol.* 1995(b); 146: 1433-1443.

Wilkerson MJ., Davis WC., Cheevers WP: Peripheral blood and synovial fluid mononuclear cell phenotypes in lentivirus induced arthritis. *J. Rheumatol.* 1995(a); 22: 8-15.

Wills JW., Craven RC: Form, function and use of retroviral *gag* proteins. *AIDS.* 1991; 5: 639-654.

World Health Organization: Guidelines for biological safety cabinets. AIDS No. 9 Geneve. Switzerland: WHO: 1992.

Wishino Y., kameoka M., Okada Y., Zhong Q., Kimura T., Azuma I: *In vivo* induction of human immunodeficiency virus type 1- specific cytotoxic T lymphocytes

and delayed- type hypersensitivity by a 23 – amino acid peptide from the highly conserved región in major core protein p24. *Vaccine*. 1994; 12: 485-491.

Yahi N., Baghdiguian S., Moreau H., Fantini J: Galactosyl ceramide (or a closely related molecule) is the receptor for human immunodeficiency virus type 1 on human colon epithelial HT29 cells. *J. Virol*. 1992; 66: 4848-4854.

Zanoni RG., 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 RG: Phylogenetic analysis of small ruminant lentiviruses. *J. Gen. Virol*. 1998; 79: 1951-1961.

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

Zink MC and Narayan O: Lentivirus – induced interferon inhibits maturation and proliferation of monocytes and restricts the replication of caprine arthritis encephalitis virus. *J. Virol*. 1989; 63 (6): 2578-2584.

Zink MC., Yager AJ., Myer DJ: Pathogenesis of caprine arthritis encephalitis virus: Cellular localization of viral transcripts in tissues of infected goats. *Am. J. Path*. 1990; 136: 843-854.

8. Anexo.

8.1 Análisis estadístico, gráfica 1.

Adjusted Univariate Tests for Repeated Measure (Ricardo7.sta) Sigma-restricted parameterization							
Effect	Degr. of Freedom	F	p	G-G Epsilon	G-G Adj. df1	G-G Adj. df2	G-G Adj. p
TIPOCEL	2	217.5291	0.000003	0.675908	1.351817	4.055451	0.000003
TIPOCEL*grupo	2	1.5459	0.287415	0.675908	1.351817	4.055451	0.298000
Error	6						
TIEMPO	11	1.8000	0.094426	0.090909	1.000000	3.000000	0.272000
TIEMPO*grupo	11	1.8000	0.094426	0.090909	1.000000	3.000000	0.272000
Error	33						
TIPOCEL*TIEMPO	22	2.6909	0.001037	0.095545	2.101986	6.305958	0.142000
TIPOCEL*TIEMPO*grupo	22	0.4832	0.970347	0.095545	2.101986	6.305958	0.646000
Error	66						

8.2 Análisis estadístico, gráfica 2.

Adjusted Univariate Tests for Repeated Measure (Ricardo7.sta) Sigma-restricted parameterization							
Effect	Degr. of Freedom	F	p	G-G Epsilon	G-G Adj. df1	G-G Adj. df2	G-G Adj. p
TCEL	2	1752.260	0.000000	0.502413	1.004826	3.014477	0.000029
TCEL*grupo	2	6.833	0.028403	0.502413	1.004826	3.014477	0.079008
Error	6						
TIEMPO	11	0.600	0.814979	0.090909	1.000000	3.000000	0.495025
TIEMPO*grupo	11	0.600	0.814979	0.090909	1.000000	3.000000	0.495025
Error	33						
TCEL*TIEMPO	22	3.952	0.000008	0.083701	1.841427	5.524282	0.087637
TCEL*TIEMPO*grupo	22	1.877	0.342562	0.083701	1.841427	5.524282	0.237675
Error	66						