

01672



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

DISTRIBUCIÓN TOPOGRÁFICA DE LAS LESIONES EN ENCÉFALO  
DE CERDOS LACTANTES, INOCULADOS EXPERIMENTALMENTE  
CON EL RUBULAVIRUS (PARAMYXOVIRUS) PORCINO DE LA  
ENFERMEDAD DE OJO AZUL: COMPARACIÓN DE DOS TÉCNICAS  
INMUNOHISTOQUÍMICAS.

## T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRA EN CIENCIAS VETERINARIAS

PRESENTA:

ROXANA MENDOZA GALICIA

ASESOR: MVZ MSC JOSÉ MIGUEL DOPORTO DÍAZ

COASESORES: MVZ Ph. D. FERNANDO CONSTANTINO CASAS.  
MVZ Ph. D. JUAN B. DE LA S. F. PEDRO PRADAL ROA



MÉXICO, D.F.

2004



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

## AGRADECIMIENTOS

A mis padres.

A mi Jurado: Dr. Abel Ciprian Carrasco, Dra. Ma. Elena Trujillo Ortega, Dr. Enrique Aburto Fernández, Dr. Fernando Constantino Casas y Dr. Pedro Pardal Roa, por el tiempo que cedieron para evaluar este trabajo y los valiosos comentarios que le mejoraron.

A mis asesores: José Miguel Doportó Díaz, Fernando Constantino Casas y Dr. Pedro Pardal Roa por creer en éste plan y ayudarme a concretarlo.

Al Dr. Fernando Constantino Casas por todo el tiempo y apoyo destinados a la culminación de éste proyecto.

Biólogo Armando Medina Cruz del Laboratorio de Patología, Hospital General de México por su tiempo y ayuda en la realización de éste trabajo.

Histotecnóloga. Guadalupe Juárez del Departamento de Patología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, por su trabajo y gentil interés en la finalización de éste trabajo.

Dres. Carmen Mercado García y Humberto Ramírez Mendoza del Departamento de Producción Animal: Cerdos, por la donación del virus y sus enseñanzas en el Laboratorio.

Dr. Luis Pando por sus valiosos comentarios y correcciones al trabajo.

MVZ J. Iván Sánchez B., Srta. Silvia Hernández, MVZ Alberto Foyoux, MVZ Miguel Robles B., MVZ Víctor M. Petrone G., Dr. Luis E Oropeza., MVZ Jesús Hernández<sup>†</sup>, MVZ Rosalba Carreón N., MVZ Roberto Martínez G. y MVZ Marco A. Herradora L., por su amable ayuda.

A mis maestros Reyna Sánchez San Martín y José Miguel Doportó Díaz.

Esta investigación fue financiada parcialmente por CONACYT a través del proyecto: Desarrollo de técnicas inmunohistoquímicas para diagnóstico e investigación en Medicina Veterinaria.

## RESUMEN

La enfermedad del ojo azul (EOA), es una afección de los cerdos asociada a la infección con un Rubulavirus (Paramyxoviridae). A partir de este trabajo se definió parte de la patogenia de ésta enfermedad y se establecieron dos opciones de diagnóstico asertivo. La investigación se realizó en cerdos de dos días de edad, con el fin de establecer la evolución de signos clínicos, las lesiones histológicas en encéfalo y su distribución topográfica. Así como comparar los resultados de dos técnicas inmunohistoquímicas. Se utilizaron 36 cerdos híbridos, de dos días de edad, provenientes de una granja comercial, negativa a enfermedades virales como Aujeszky, Fiebre Porcina Clásica, EOA y GET; mismos que fueron alojados en dos áreas de aislamiento del DPA:C, FMVZ-UNAM. El grupo experimental (30 cerdos), fue inoculado con 3 mL de *Rubulavirus* porcino (PoRV)  $1 \times 10^7$  TCID<sub>50</sub>/mL y sacrificados en subgrupos de cinco, a 1, 3, 4, 5, 6 y 7 días pi. Uno de los cerdos del grupo testigo, fue sacrificado al mismo tiempo. Las muestras de suero de todos los animales, antes de la inoculación y al sacrificio, resultaron negativos a la presencia de anticuerpos contra el PoRV, a través de la técnica de IH. En estadios tempranos se observó parálisis flácida de miembros pelvianos, y en etapas avanzadas: desplazamiento en círculos, incoordinación, postración, corea y coma. Posterior al sacrificio de cada cerdo, se obtuvo el encéfalo y se fijó en formalina. Se obtuvieron diez cortes coronales, que fueron embebidos en parafina y teñidos con cuatro métodos: H-E, methyl verde-pironina, streptavidina-biotina peroxidasa y auramina rhodamina peroxidasa, usando un anticuerpo policlonal. En los cortes teñidos con H-E, los hallazgos microscópicos fueron discretos, caracterizados por degeneración neuronal, gliosis, satelitosis, focos de apoptosis y cuerpos de inclusión. Los cambios morfológicos encontrados y la distribución de reacción positiva en las preparaciones inmunohistoquímicas, se asocian a los signos clínicos observados y sugieren daño a las estructuras de la vía corticoespinal. Otro proceso que se asocia a la signología y los hallazgos microscópicos, es el síndrome de neurona motora inferior.

**Palabras clave:** Rubulavirus porcino, Enfermedad de ojo azul, inmunohistoquímica, signología nerviosa.

## ABSTRACT

Blue Eye Disease (BED) is a disorder associated to a Rubulavirus (Paramyxoviridae) infection in pigs. The aim of this study was to identify the relation between histological brain lesions and their topographic distribution, supported by two immunohistochemical techniques as an option of accurate diagnosis. Thirty six crossbred, weaned pigs, 2 days old, serologically negative to viral diseases such as Pseudorabies, Hog cholera, BED and TGE, obtained from a commercial farm, were randomly distributed into two groups and located into two isolated areas. Experimental group (30 pigs), was inoculated with 3 mL of Porcine rubulavirus (PoRV)  $1 \times 10^7$  TCID<sub>50</sub>/mL, and humanely euthanized on groups of five, at 1, 3, 4, 5, 6 and 7 days pi. One control pig was euthanized at the same time as each experimental subgroup. Serum samples from the experimental and control pigs were obtained before inoculation and during euthanasia, all were negative to the presence of antibodies against the PoRV through an HI test. Once the pigs were euthanized, brain was removed and formalin fixed. Ten coronal sections were paraffin embedded and stained using four different methods: H-E, methyl green-pyronin, streptavidin-biotin peroxidase and auramine-rhodamine, using a polyclonal antibody obtained. H-E slides showed light leptomeningeal oedema, middle neuronal degeneration, light gliosis, satellitosis, apoptotic foci and eosinophilic intracytoplasmatic inclusion bodies. Morphological changes and positive reaction on immunohistochemistry slides, are closely related to clinical signs and suggest damage to corticoespinal via. Lower motoneuron syndrome is also associated to clinical signs and histological changes.

**Key words: porcine Rubulavirus, Blue eye disease, immunohistochemistry, nervous signs.**

## LISTA DE CONTENIDO

Agradecimientos .....	ii
Resumen .....	iii
Abstract.....	iv
Lista de contenido.....	v
Lista de cuadros .....	vi
Lista de figuras .....	vii
Lista de abreviaturas .....	viii
Capítulo 1: Introducción .....	1
1.1 Antecedentes del <i>Rubulavirus</i> porcino.....	2
1.2 Taxonomía viral.....	2
1.3 Características del virus.....	3
1.4 Patogenia .....	13
1.5 Métodos diagnósticos de la Enfermedad de Ojo Azul.....	16
1.6 Métodos alternativos para el diagnóstico de la EOA.....	16
1.7 Técnica de inmunofluorescencia .....	19
1.8 Técnicas inmunohistoquímicas .....	24
Justificación.....	33
Hipótesis.....	34
Objetivos.....	35
Capítulo 2: Material y Métodos .....	36
2.1 Inóculo viral .....	36
2.2 Anticuerpo policlonal.....	37
2.3 Instalaciones. ....	38
2.4 Unidades experimentales .....	39
2.5 Grupos de estudio.....	39
2.6 Procesamiento de las muestras .....	41
Capítulo 3: Resultados.....	47
Capítulo 4: Discusión.....	54
Capítulo 5: Conclusiones.....	59
Literatura citada.....	61
Cuadros.....	74

## LISTA DE CUADROS

<i>Número</i>	<i>Página</i>
Cuadro 1. Citoarquitectura y resultados de la técnica de streptavidina-biotina peroxidasa.....	74
Cuadro 2. Citoarquitectura y resultados de la técnica de auramina-rhodamina (inmunofluorescencia indirecta).....	77
Cuadro 3. Evaluación estadística de los resultados obtenidos con ambas técnicas Inmunohistoquímicas, utilizando la prueba de $\chi^2$ .....	80

## LISTA DE FIGURAS

<i>Número</i>	<i>Página</i>
Figura 1. Representación esquemática de un Paramyxovirus.....	3
Figura 2. Mapa genético del <i>Rubulavirus</i> porcino de los fines 3' a 5'.....	7
Figura 3. Secuencias genéticas flanqueadas y propias de género; analogía con el virus de la papera humana.....	7
Figura 4. Método de inmunofluorescencia directa.....	22
Figura 5. Método de inmunofluorescencia indirecta.....	23
Figura 6. Método de inmunohistoquímica directa.....	25
Figura 7. Método de inmunohistoquímica indirecta.....	25
Figura 8. Método del anticuerpo no marcado.....	26
Figura 9. Método de peroxidasa-anti-peroxidasa.....	27
Figura 10. Método de biotina-streptoavidina.....	29
Figura 11. Ecuación que describe la oxidación de un cromógeno.....	30
Figura 12. Representación esquemática de inoculación de conejos para la obtención de anticuerpos policlonales contra el <i>Rubulavirus</i> porcino.....	37
Figura 13 Descripción de los diferentes grupos de sacrificio.....	40
Figura 14 Niveles de corte efectuados en encéfalo.....	41
Figura 15 Descripción de los diferentes niveles de corte efectuados en encéfalo.....	42
Figura 16 Corteza parietal. Tinción: H-E, Gliosis, degeneración neuronal y satelitosis.....	49
Figura 17 Corteza temporal. Tinción: H-E. Cuerpo de inclusión intracitoplasmático.....	50
Figura 18 Corteza temporal. Tinción de Metil verde pironina, reacción positiva en citoplasma...	50
Figura 19 Corteza temporal, 3 días p.i., tinción de streptavidina-biotina peroxidasa.....	53
Figura 20 Tálamo, 3 días p.i., tinción de auramina-rhodamina .....	53



## LISTA DE ABREVIATURAS

EOA	Enfermedad de Ojo Azul
DPA:C	Departamento de Producción Animal: Cerdos
FMVZ-UNAM	Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia – Universidad Nacional Autónoma de México.
RP	<i>Rubulavirus</i> porcino
IH	Inhibición de la hemoaglutinación
H-E	Hematoxilina-eosina
BED	Blue eye disease
GET / TGE	Gastroenteritis Transmisible / Transmissible Gastroenteritis
PR	Porcine <i>Rubulavirus</i>
HI	Hemoagglutination inhibition
ELISA	Inmunoensayo enzimático
RNA	Ribonucleic acid
Nm	Nanometros
g/mL	Gramos por mililitro
Kb	Kilobase
SDS-Page	Sodium Dodecyl Sulfate - PolyAcrylamide Gel Electrophoresis
N o NP	Proteína ligada al RNA
P	Fosfoproteína
L	Proteína larga, asociada a la polimerasa
M	Proteína de Matriz
G	Proteína de adhesión
HN	Hemaglutinina-neuraminidasa
RNA <sub>m</sub>	Ácido ribonucleico mensajero
KD	KiloDalton
PH	Potencial Hidrógeno
F	Proteína de fusión
SH	Proteína corta hidrofóbica
°C	Centígrados
MAA	Lectina de <i>Maackia amurensis</i>
HMC	Complejo principal de histocompatibilidad
IF	Inmunofluorescencia
AV	Aislamiento viral
SN	Sueroneutralización
PK	Células de riñón de cerdo
AA	Actividad amplificadora
AM	Actividad moduladora
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
Fc	Fragmento cristalino

1 <sup>o</sup>	Primario
2 <sup>o</sup>	Secundario
Ac-1	Anticuerpo primario
Ac-2	Anticuerpo secundario
Ac-3	Anticuerpo terciario
Fab	Fragmento de unión al antígeno
PAP	Peroxidasa-anti-peroxidasa
ABC	Avidina-biotina-peroxidasa
BSA	Streptoavidina-biotina
IgG	Inmunoglobulina G
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de Hidrógeno
H <sub>2</sub> O	Molécula de agua
H <sub>2</sub> R	Reactivo hidroxilado
R	Reactivo
DAB	Diaminobenzidina
AEC	Aminoetilcarbazol
OPD	Ortofenilendiamina
TMB	Tetrametilbenzidina
CN	Cloronaftol
SNC	Sistema Nervioso Central
Pac	Producción Animal Cerdos
MEM	Medio esencial mínimo
µg/mL	Microgramos por mililitro
Rpm	Revoluciones por minuto
Mm	Micrometros
VERO	Células de riñón de mono verde
pi	Post inoculación
UHA	Unidades hemaglutinantes
ML	Microlitros
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos
TCID	Dosis infectante cultivo celular
RTPCR	Transcriptasa reversa de la reacción en cadena de la polimerasa
PM	Peso molecular
g/L	Gramos por litro
cm	Centímetro
NRC	Nutrition Research Council
DNA	Ácido Desoxiribonucleico
TIFF	Tagged Image File Format (formato de imagen)

## Capítulo 1

### 1. INTRODUCCIÓN

La Enfermedad del Ojo Azul (EOA) es una afección de los cerdos asociada a la infección con un Rubulavirus (Paramyxovirus) (Stephano y cols., 1986, 1988; Stephano, 1993; Reyes y cols., 1993). La primera notificación de un brote de la enfermedad fue en una granja porcina en La Piedad, Michoacán y se remonta a 1980. A partir de entonces se ha diagnosticado en otros estados de la República Mexicana, entre ellos, Campeche, Colima, Guanajuato, Hidalgo, Jalisco, México, Morelos, Puebla, Querétaro, Quintana Roo, Sonora y Veracruz. (Fuentes y cols., 1992, 1989; Stephano *et al.*, 1985, 1986, 1988, 1999). En un estudio retrospectivo, Rosales y colaboradores (1988), determinaron anticuerpos inhibidores de la hemaglutinación en sueros de cerdo, almacenados desde el año 1972.

La Enfermedad del Ojo Azul se caracteriza por signos nerviosos, los animales más susceptibles son los lechones entre 2 y 15 días de edad. En animales adultos la enfermedad se caracteriza por falla reproductiva (Stephano, 1999).

Durante un brote típico de la EOA en granjas productoras de cerdos para el abasto, ésta involucra del 20 al 65% de las camadas en el área de maternidad; en estos animales, la morbilidad varía de 20 a 50% observándose signos nerviosos, fiebre y opacidad corneal (Stephano y Gay, 1985; Stephano *et al.*, 1993). Dependiendo del sistema de manejo existente en la granja, la mortalidad en lechones varía del 87 al 90% durante 2 a 9 semanas (Stephano y cols., 1988, 1993). En los cerdos adultos se manifiesta falla reproductiva, caracterizada en las hembras por incremento en el porcentaje de repeticiones, mortinatos y momias (Stephano y cols., 1988) y en los machos por orquitis, disminución en la producción de semen (Visuet *et al.*, 1996) y alteraciones morfológicas en espermatozoides (cabezas desprendidas, daño acrosomal mayor al 50%, aglutinación y presencia de gota citoplasmática) (Espinosa y cols., 2001).

Con base en lo anterior, se deduce que el impacto de esta enfermedad en la porcicultura nacional, es principalmente económico. Debido a que una vez que se manifiesta la EOA en los animales de una granja porcina, es capaz de provocar alteraciones en los ciclos de producción. A pesar de que actualmente se cuenta con técnicas de ELISA, métodos de manejo y varias vacunas de virus muerto para diagnosticar y controlar esta enfermedad, aún no se cuenta con métodos eficaces para prevenirla (Stephano y cols., 1985, Stephano *et al.*, 1999).

### **1.1 Antecedentes del *Rubulavirus* porcino.**

En 1994, durante el 1er *Simposium* Internacional sobre la Enfermedad del Ojo Azul, llevado a cabo en la Ciudad de Puebla, México, investigadores de Suecia, República de Irlanda y México, discutieron sobre la etiología, patogenia, lesiones macroscópicas y microscópicas, así como la problemática en el diagnóstico de la enfermedad. En esta reunión, los investigadores participantes acordaron denominar al Paramyxovirus porcino como agente etiológico de la Enfermedad del Ojo Azul, así como denominarla Enfermedad del Ojo Azul, y no Síndrome del Ojo Azul (Anónimo, 1994).

### **1.2 Taxonomía viral**

El virus de la EOA es un virus RNA, que con base en sus características morfológicas, su organización genómica, la actividad biológica de proteínas y la secuencia de las proteínas codificadas, actualmente se clasifica dentro del orden de los Mononegavirales (cadena única, de sentido negativo, no segmentada), Familia: *Paramyxoviridae*, subfamilia: *Paramyxovirinae* y Género *Rubulavirus* (Rima *et al.*, 1995; Murphy, 1996, Lamb and Kolakofsky, 2001). Este agente infeccioso ha sido denominado *Rubulavirus* porcino y su acrónimo en el Genbank es PoRV (ICTV, 2002). En este género se incluye el virus de la papera humana, virus de la *Parainfluenza* humana 2, 4a y 4b, virus de la enfermedad de Newcastle (*Paramyxovirus* aviar 1), *Paramyxovirus* aviar 2 (virus Yaicapa), los paramyxovirus aviares 3, 4, 5 (virus Kunitachi), 6, 7, 8 y 9; y los virus de la parainfluenza de los simios 5 y 41 (Murphy, 1996; Murphy *et al.*, 1999 ).

### 1.3 Características del virus

El *Rubulavirus* porcino es pleomórfico, pero generalmente es de forma esférica y mide entre 135 – 148 nm a 257 – 360 nm. Posee una envoltura básicamente lipídica, con peplómeros; dentro de esta envoltura, se encuentra una nucleocápside helicoidal. La nucleocápside mide entre 1,000 y 1,630 nm de largo, con diámetro de 20 nm (Figura 1). La velocidad de sedimentación del virión es de 1.21 g/mL en sucrosa. El genoma consiste de una molécula única de RNA lineal, de sentido negativo, que mide entre 16 y 20 kb (Stephano, 1999; Sundqvist *et al.*, 1990).

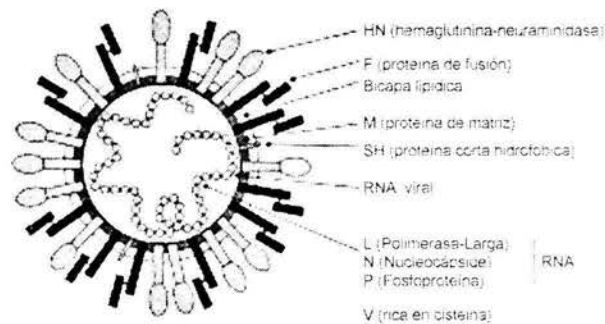


Figura 1 Representación esquemática de un Paramyxovirus (tomado de Fields virology, 2001).

#### Estructura viral

Al igual que otros viriones pertenecientes al género Paramyxovirus, el *Rubulavirus* porcino posee 10 a 12 proteínas. En 1990, Sundqvist, a través del método SDS-Page, identificó las proteínas estructurales del *Rubulavirus* porcino que son comunes a todos los géneros. Se mencionan tres proteínas asociadas a la nucleocápside (N o NP, una proteína ligada al RNA; P, una fosfoproteína y L, una proteína larga, asociada a la polimerasa), una proteína de envoltura, no glicosilada (M), y dos proteínas de envoltura, glicosiladas, que incluyen una proteína de fusión (F) y una proteína de adhesión (G, H o HN) (Sundqvist *et al.*, 1990; Murphy, 1996).

### **Proteínas asociadas a la nucleocápside**

Estas son ribonucleoproteínas y se les denomina Nucleoproteína (NP) y Fosfoproteínas P y L, mismas que son codificadas por los genes P del virus. Las dos primeras son codificadas por el mRNA de los genes P, pero son traducidas usando diferentes codones de iniciación de metionina y secuencias de lectura superpuestas.

El peso molecular de la proteína NP es de 68 kD, el de la fosfoproteína P es de 52 kD y el de la fosfoproteína L, es de 200 kD (Sundqvist *et al.*, 1990).

La **proteína Matriz** o proteína **M**, tiene un peso molecular de 40 kD (Sundqvist, 1990), es una proteína básica (en pH neutro posee una carga neta positiva) y la más abundante en los viriones (Voet *et al.*, 1995). Se cree que funciona de modo parecido a su homóloga en los Rhabdovirus, la proteína M es el organizador central en la morfogénesis viral, y puede interactuar tanto con ella misma, como con la nucleocápside viral y los C-terminales (anclas de la transmembrana) de las proteínas F y H. Por lo tanto, esta proteína es importante para la extrusión viral de la célula y para la infectividad viral (Lamb and Kolakofsky, 1996).

### **Proteínas de envoltura**

Los virus pertenecientes a la familia Paramyxoviridae poseen dos membranas o proteínas que les envuelven, una está relacionada con la **fijación** a la célula y la otra con la **fusión** a la membrana de la célula huésped, independientemente del pH. Las proteínas de **fijación** se unen a los receptores celulares que contienen ácido siálico, propiedad que les permite aglutinar eritrocitos (hemaglutinación). Es posible que la proteína H del *Rubulavirus* porcino posea afinidad alta por el ácido siálico, pues se ha descrito el tropismo del virus por células que expresan ésta substancia en su membrana (Reyes y cols., 1993; Vallejo y cols., 2000). Los Paramyxovirus y Rubulavirus, poseen hemaglutininas virales que además tienen actividad de neuraminidasa, por lo que se les denomina **proteínas HN** (hemaglutinina-

neuraminidasa). Esta proteína, en el caso del Rubulavirus porcino, tiene peso molecular de 66 kD. La neuraminidasa, cataliza la hidrólisis de la unión a través de la fusión de una terminal de ácido siálico residual con una D-galactosa o una D-galactosamina residual. También se le atribuye la capacidad de facilitar el transporte de viriones hacia y desde el sitio de infección a través de la mucina (Voet *et al.*, 1995). Además, previene la agregación de las partículas virales a la membrana de la célula huésped durante el proceso de extrusión de los viriones, lo que facilita la liberación de las partículas virales de la célula infectada.

Por lo tanto, la neuraminidasa debe ser neutralizada en la fase inicial del proceso de infección y ser activada en el proceso de liberación de viriones. Este proceso de bloqueo y activación está regulado por el pH y la concentración de iones haluro (compuestos binarios formados por la combinación de un halógeno con un radical electropositivo). De tal manera que la concentración de iones haluro y el pH del espacio extracelular son convenientes para la activación de la hemaglutinina, mientras que el pH ácido en el aparato de Golgi es conveniente para la activación de la neuraminidasa (Lamb and Kolakofsky, 1996).

La proteína de fusión **F**, cuyo peso molecular es de 59 kD, participa en la fusión de las membranas viral y celular, así como en la actividad hemolizante del virus; a través de la fragmentación específica de una proteasa del hospedador, de un precursor  $F_0$ , a la producción de una proteína **F** activa, compuesta por un fragmento N-terminal ( $F_2$ ) y un fragmento más largo C-terminal ( $F_1$ ). Estos dos fragmentos permanecen unidos por un enlace bisulfuro. El proceso de proteólisis expone una región hidrofóbica y fusotrópica en el N-terminus del  $F_1$ . La región altamente hidrofóbica de la proteína **F** está protegida del espacio acuoso que la rodea, debido a que el contacto con el agua podría causar una agregación de proteínas. Presumiblemente, hay un cambio de conducta durante la infección viral en el que se produce una exposición de la zona de fusión, de un modo similar al descrito para el

virus de la influenza, e induce la fusión a un pH neutro. De este modo, los virus de la familia *Paramyxoviridae* son capaces de inducir una fusión desde fuera.

La capacidad de fusión celular que caracteriza a los Paramyxovirus facilita la infección a células adyacentes y la formación de sincitios (Charles *et al.*, 1980; Kingsbury, 1990, Voet *et al.*, 1995).

*Otras proteínas de envoltura.* Los Rubulavirus contienen un gen pequeño llamado **SH** (*short hydrophobic protein*, proteína corta hidrofóbica) localizada entre F y HN. Es una proteína integral de la membrana cuya función se desconoce (Lamb and Kolakofsky, 1996).

### **Relaciones antigénicas**

A partir de la clonación y secuenciación de los genes que codifican a las proteínas de la matriz (M), (Berg *et al.*, 1991), hemaglutinina-neuraminidasa (HN) (Sundqvist *et al.*, 1992) y fosfoproteína (P), Berg *et al.* en 1991, muestran la estrecha relación que el virus de la EOA, guarda con otros miembros del grupo de los Rubulavirus (Figura 2). Por su parte, Sundqvist *et al.*, en 1990 prueban que el *Rubulavirus* porcino tiene 43 y 41 % de similitud en la secuencia de aminoácidos de las proteínas de hemaglutinina y neuraminidasa con los virus de la papera humana y el de parainfluenza 5 de los simios, respectivamente, Figura 3.

En 1999 en Malasia se aisló e identificó un virus que afecta a los porcinos. Se trata de un Paramyxovirus, que afectó a cerdos en los años 1998 y 1999, produciendo fiebre, estornudo y tos, signología nerviosa (movimientos de carrera, mioclonia, incoordinación y nistagmus), así como abortos tempranos en hembras gestantes. En estos casos el 100% de los animales estaban infectados, pero la mortalidad fue de hasta 40% en lechones y de 1 a 5 % en cerdos de engorda y pie de cría. Este virus además ocasionó cuadros de encefalitis en empleados de las granjas afectadas, causando enfermedad a 265 personas y la muerte de 105 de ellas





### Proceso de replicación viral.

El ciclo de replicación de los Paramyxovirus como el *Rubulavirus* porcino, está compuesto por las fases de adhesión, penetración, maduración y liberación. En el proceso de infección las proteínas hemaglutinina-neuraminidasa (HN) localizadas en su superficie, facilitan la **adhesión** del virus a los receptores en las células del hospedador. Por su parte, la proteína F, participa en la fusión de las membranas viral y celular, aun a pH 7. Esto permite que la nucleocapside sea liberada directamente en el citoplasma (**penetración**) e inicie la transcripción (Murphy *et al.*, 1995; Charles *et al.*, 1980; Kingsbury, 1990).

El proceso de transcripción de los Paramyxovirus consiste en una replicación primaria, conocida también como **edición**, de la nucleocapside viral. Queda expuesta la información genética del RNA viral y el gen P codifica las proteínas P y V; dos proteínas reguladoras de pasos subsecuentes de la reproducción viral. El siguiente paso es la producción de macromoléculas específicas del virus. En la replicación genómica, las secuencias que no están expresadas en el RNAm durante la síntesis de RNA de transcripción, deben ser incorporadas a un RNA de banda positiva (antigenoma) que sirve como plantilla intermedia para la síntesis de progenie de genomas de banda negativa.

El sitio de arranque de la síntesis de RNA de transcripción y el de replicación es el punto 3' de la plantilla guía de RNA, lo cual provee un sitio de coincidencia entre los dos tipos de RNA. El ensamblaje de nucleocapsides ocurre en el citoplasma en dos fases: *i*) combinación de unidades estructurales con genoma o RNA antigenómico para formar la plantilla helicoidal de ribonucleoproteínas y *ii*) la adición subsecuente de proteínas auxiliares de nucleocapside a la plantilla. Posteriormente, las proteínas virales sufren un proceso de modificación, para lo cual utilizan los métodos celulares para la síntesis de glicoproteínas de membrana. La adición programada de azúcares ocurre en forma secuencial, a medida que la proteína se mueve

progresivamente en una vesícula desde el retículo endoplasmico rugoso hacia el aparato de Golgi y de ahí hacia la membrana plasmática.

Las cadenas laterales de las glicoproteínas de envoltura viral, generalmente son una combinación de oligosacaridos simples y compuestos, cuya composición está determinada por las glicosiltransferasas presentes en la célula en la que se replique el virus. El ensamblaje de la envoltura ocurre en la superficie celular. Las glicoproteínas virales, reemplazan a la mayoría de las proteínas celulares endógenas de la bicapa lipídica en una región de la membrana plasmática. Las moléculas glicoprotéicas virales se asocian en oligomeros para formar la típica forma de bacilo con un polo hidrofílico que se proyecta hacia la superficie externa de la membrana, un polo hidrofóbico transmembranal de anclaje, y un polo hidrofílico pequeño que se proyecta ligeramente hacia el citoplasma. Las proteínas de Matriz, se adhieren al polo citoplásmico del peplomero glicoproteico. Posteriormente, la proteína de la nucleocapside reconoce a la proteína de matriz, se unen los extremos de la membrana y se inicia la gemación de los viriones (Kingsbury, 1990; Murphy, 1999). En el proceso de infección a células adyacentes participa nuevamente la proteína F (Charles *et al.*, 1980; Kingsbury, 1990).

### **Propiedades fisicoquímicas del virus**

El *Rubulavirus* porcino es sensible a la acción de solventes tales como éter, cloroformo, formalina y  $\beta$ -propiolactona. El tratamiento con formalina suprime tanto la actividad infectante como la capacidad hemaglutinante. Además, este virus es inactivado al someterlo a 56°C durante 4 horas.

El *Rubulavirus* de la EOA, es capaz de aglutinar eritrocitos de pollo, cuye, ratón, rata, conejo, hámster, caballo, cerdo, chivo, perro y cuatro tipos sanguíneos de humano (A, B, AB y O) (Stephano, 1999). Sin embargo, se obtienen mejores

resultados al utilizar eritrocitos de bovino al 0.5% (Ramírez y cols., 1996). La elución espontánea ocurre de 30 a 60 minutos, a 37°C (Stephano, 1999).

### **Replicación *in vitro***

El virus es capaz de replicarse en cultivos celulares de riñón de cerdo, tiroides bovina, embrión bovino, dermis equina, testículo de cerdo, riñón de gato y riñón de hámster lactante-21días y células Vero, entre otros (Moreno-López *et al.*, 1986). Como resultado de la replicación viral en estos cultivos celulares, es posible observar vacuolas citoplasmáticas, formación de sincitios y cuerpos de inclusión intracitoplasmáticos e intranucleares, entre otros efectos citopáticos (Moreno-López *et al.*, 1986; Stephano, 1999).

A partir de la inoculación y exposición de diferentes especies animales al *Rubulavirus* porcino, no ha sido posible reproducir los signos clínicos, así como las lesiones macro y microscópicas características de la enfermedad. De esta manera se demostró la especificidad del virus por los miembros de la familia de los *suidos*. Como resultado de estos experimentos, se concluyó que los gatos, las ratas de laboratorio y silvestres, son capaces de producir anticuerpos específicos, en ausencia de signos clínicos (Cuetero y cols., 1995; Ramírez y cols., 1996; Toschi, 1971). Se ha relacionado a las proteínas HN en la generación de inmunidad en un proceso infeccioso (Charles *et al.*, 1980; Kingsbury, 1990).

Se ha demostrado el tropismo tisular y de células blanco por un virus en particular, a partir de la coincidencia estereoquímica entre lectinas virales y receptores complementarios, compuestos por glicanos, en la superficie de las células del hospedero. La membrana citoplasmática de las células eucariotas está constituida principalmente por glicoproteínas y glicolípidos. El ácido siálico forma parte de una familia de azúcares carboxilados de nueve carbonos que forman parte final de las cadenas de oligosacáridos de numerosas glicoproteínas solubles y de membrana.

El ácido 5-N-acetil-neuraminico es considerado el precursor de los ácidos sialicos restantes (Lehninger *et al.*, 1993).

En el caso de los porcinos, la infección por virus de Influenza, Coronavirus, Rotavirus y Rubulavirus, está determinada por las uniones específicas entre las proteínas virales de adhesión y las células que expresan ácido-sialico (Schultze, 1996 y Reyes, 1997).

El *Rubulavirus* porcino, al igual que el virus Senday, se adhiere con mayor facilidad a células que contengan receptores compuestos por moléculas de gangliosidos (sialil  $\alpha$  2,3 lactosa), tales como el epitelio bronquial y tejido nervioso (Reyes y cols., 1993). En el 2000, Vallejo y colaboradores, mediante inmunohistoquímica, expusieron cortes histológicos de cerebro de cerdos recién nacidos a la presencia de varias lectinas y observaron que diferentes áreas de SNC (sistema nervioso central) eran positivas a ellas y que la capa molecular del cerebelo así como la piramidal del hipocampo eran positivas a las aglutininas de *Maackia amurensis* (MAA), la cual es específica para el ácido Neu 5Ac $\alpha$ 2,3 Gal .

En estudios experimentales fue posible observar signos nerviosos y lesiones semejantes a las descritas en brotes de campo, mediante la inoculación del *Rubulavirus* porcino en lechones de un día de edad (Stephano, 1983, 1988). Pérez y colaboradores (1987), describen las lesiones microscópicas observadas en encéfalos de lechones infectados experimentalmente con el *Rubulavirus* porcino, las cuales corresponden a focos de espongirosis en cerebelo, acompañadas de degeneración neuronal e inclusiones-intracitoplasmáticas en las células piramidales (de Purkinje) (Pérez, 1988). Stephano y col. mencionan además, la presencia de meningitis no supurativa (Stephano, 1988), gliosis moderada difusa y vasculitis parenquimatosa (Stephano, 1986, 1988). En los animales recién nacidos, el índice de expresión de gangliósidos y moléculas de carbohidratos es elevado, lo que

sugiere una relación entre la edad de los individuos, la susceptibilidad a contraer la enfermedad y la presentación de un cuadro clínico nervioso (Reyes y cols., 1993).

Hernández y colaboradores, refieren diferencias biológicas y estructurales entre dos grupos de paramyxovirus porcino. A partir del uso de electroforesis en geles de poliacrilamida diferenciaron entre aislamientos virales que inducen un cuadro clínico neurológico, denominado Grupo I y aquellos que producen principalmente cuadro clínico reproductivo, Grupo II. Los miembros del Grupo I, presentaron mayor expresión de las proteínas HN y NP con proteína M de 66 y 68 kD (Hernández y cols., 1994).

## 1.4 Patogenia

La patogenia de esta enfermedad se ha descrito con base en las lesiones microscópicas y como se mencionó, por la presencia de gangliosidos como receptores de membrana, que en animales jóvenes abundan en sistema nervioso central y pulmón (Reyes y cols., 1993). Con base en lo anterior, se ha propuesto que el agente infeccioso ingresa por vía nasal.

Como en otras enfermedades de etiología viral, se ha propuesto como sitio de primera replicación a las tonsilas, a partir de ésta replicación, se produce una viremia. A partir de ésta, los virus alcanzan los órganos blanco, principalmente pulmón y encéfalo, riñón, bazo, hígado y linfonodos mesentéricos, a través de las vías linfática y sanguínea. Stephano y colaboradores (1988) sugieren que otro sitio de replicación es el epitelio nasal. De esta manera, Allan y colaboradores, así como Ramírez-Herrera y cols., sugieren que el virus alcanza encéfalo a partir de la infección de terminaciones del nervio trigémino en fosas nasales y al encéfalo a través de bulbos olfatorios, combinado con una viremia y paso a través de la barrera hematoencefálica. Ambos grupos de estudio, han identificado al virus tanto en bulbo olfatorio, tracto olfatorio y cerebro medio, entre los días 3 a 7 días post infección (Allan *et al.*, 1996; Ramírez-Herrera y cols., 1997).

Las lesiones histológicas referidas para SNC consisten en meningitis no supurativa, gliosis focal y difusa, manguitos perivasculares y necrosis glial y neuronal, así como muy escasa presencia de corpúsculos de inclusión (Ramírez y col., 1981)

En la enfermedad de distemper canino, causada por otro miembro de la familia Paramyxoviridae, que se manifiesta con signología nerviosa, Carlton y McGabin refieren en estadios tempranos de la enfermedad la ausencia de células inflamatorias, un estado de espongiosis, acompañado de hiperplasia e hipertrofia de astrocitos con formación variable de sincitios, escasos oligodendrocitos, variable

degeneración neuronal y desmielinización. Los cuerpos de inclusión se pueden apreciar en astrocitos, células ependimarias y ocasionalmente en neuronas. En estadios tardíos de la enfermedad, se caracteriza por un grado mayor de desmielinización y un proceso inflamatorio no supurativo (infiltración perivascular, leptomeningitis y coroiditis) que puede acompañarse de degeneración tisular y presencia de macrófagos (células gitter) (Carlton and McGavin, 1995).

En casos de distemper canino tanto experimentales, como de campo, diferentes autores describen la ausencia o disminución en el número de oligodendrocitos y la consecuente desmielinización en SNC. Un proceso semejante se describe en procesos subagudos de papera humana, otra enfermedad causada por un paramyxovirus (Schobesberger *et al.*, 1999; Summers *et al.*, 1994).

### **Mecanismos de infección viral en Sistema Nervioso Central**

Se han descrito diferentes mecanismos a través de los cuales los virus son capaces de infectar al tejido nervioso. El primero refiere la diseminación de virus de sitios distantes, vía terminaciones de nervios periféricos en la mucosa nasal. Otro mecanismo consiste en rebasar las barreras encefálicas, a partir de la infección de células endoteliales de capilares profundos y “proliferar a través” de la barrera hematoencefálica.

Otros virus se localizan en los vasos sanguíneos menínges e invaden en forma progresiva el tejido subyacente.

Finalmente, se refiere la infección de los plexos coroideos y ependimocitos, con la consecuente infección del tejido cerebral a través del líquido cerebroespinal (Murphy *et al.*, 1999).

### **Evasión de los mecanismos de defensa**

El encéfalo presenta el sistema de barreras encefálicas, compuesto por dos barreras separadas 1) la hematoencefálica y 2) la hemato-líquido cerebro espinal (LCE), localizada en los plexos coroideos y equivale al 0.02% de la superficie de la



barrera hematoencefálica (Afifi, 2001). **La barrera hematoencefálica** está formada por el endotelio capilar que posee uniones estrechas entre células contiguas y una membrana basal, cuya superficie esta cubierta, aproximadamente en un 85% por células gliales. Las uniones estrechas entre las células endoteliales de los capilares encefálicos restringen la difusión intercelular de solutos y en esencia forman una capa celular continua con las propiedades de permeabilidad de una membrana plasmática. Sin embargo, en algunas regiones del encéfalo, los endotelios capilares con uniones estrechas son reemplazados por capilares con endotelios fenestrados.

Las regiones encefálicas desprovistas de barrera hematoencefálica comprenden al cuerpo pineal, órgano subcomisural, órgano subfornical, órgano vasculoso de la lámina terminal (o cresta supraóptica), eminencia media del hipotálamo, neurohipófisis y el área postrema de la médula oblonga. Estas estructuras se denominan órganos circunventriculares (Afifi y Bergman, 2001; Carpenter, 1994, Geneser, 2000).

Durante un proceso infeccioso, en fase de viremia, los órganos circunventriculares son sitios de riesgo de infiltración de partículas virales hacia sistema nervioso central y este tejido es particularmente importante para el proceso infeccioso por vía nasal, debido a que la barrera hematoencefálica aísla inmunológicamente al encéfalo, lo que le convierte en un sitio inmunológicamente privilegiado que favorece la evasión viral a la respuesta inmune, por secuestro (Murphy, 1999).

### **1.5 Métodos diagnósticos de la EOA**

Con base en los hallazgos mencionados, el diagnóstico de la enfermedad se ha llevado a cabo utilizando los métodos y técnicas de laboratorio propuestas por Gay (1986), las cuales incluyen: Inmunofluorescencia directa (IF), Inmunofluorescencia indirecta (IIF), aislamiento viral en cultivos celulares de la línea PK15 o en ratones lactantes de cinco días de edad (AV), sueroneutralización en cultivos celulares de línea PK15 (SN), inhibición de la hemoaglutinación (IH), inmunoensayo enzimático (ELISA) e inmunoperoxidasa (Gay, 1986; Moreno-López *et al.*, 1986; Allan *et al.*, 1996; McNeilly *et al.*, 1997, Morilla, 2000).

### **1.6 MÉTODOS ALTERNATIVOS PARA EL DIAGNÓSTICO DE LA EOA**

#### **Inmunohistoquímica**

Las técnicas inmunohistoquímicas forman parte de los ensayos inmunoenzimáticos, y consisten básicamente en la utilización de un anticuerpo específico, marcado, para demostrar la presencia de un antígeno, en un tejido (Coons *et al.*, 1950; Benites y cols., 1982).

#### **Ensayos inmunoenzimáticos.**

Los ensayos inmunoenzimáticos se clasifican, en términos generales, en ensayos con actividad amplificadora (AA) y ensayos con actividad moduladora (AM). Los primeros usan inmuorreagentes en exceso para obtener la máxima señal de la molécula a evaluar. La ley de acción de masas implica que aún a muy baja concentración de moléculas, una alta fracción de ellas reaccionará si el inmuorreagente se encuentra en exceso. En teoría el límite del número de moléculas detectables por AA sería 1 (Tijssen, 1985).

Opuesto a los métodos AA, la sensibilidad de los ensayos AM se incrementa con menores concentraciones de inmuorreagente debido a que si la afinidad es elevada, se requiere menor cantidad de antígeno para alcanzar el 50% de saturación de volúmenes constantes de anticuerpo. Esta aparente desventaja de

los ensayos tipo AA respecto de los AM, se compensa al usar anticuerpos monoclonales. Además, es importante considerar, que las enzimas son bastante sensibles a factores ambientales (temperatura, fuerza iónica, inhibidores o proteasas presentes en los líquidos biológicos), los cuales pueden disminuir la sensibilidad de los inmunoensayos. Por lo tanto, la capacidad de detección de los ensayos inmunoenzimáticos tipo AA es, potencialmente, superior a la de los métodos AM.

Los inmunoensayos también se clasifican de acuerdo a su diseño como de fase sólida u homogénea.

Las técnicas inmunohistoquímicas son un ejemplo de ensayo inmunoenzimático tipo AA, de fase sólida y poseen todas sus ventajas (Tijssen, 1985).

### **Evolución de las técnicas inmunohistoquímicas.**

La técnica de inmunofluorescencia (IF), desarrollada por Coons en 1941 (Coons *et al.*, 1950; Benites y cols., 1982), dio origen a **la era de la inmunohistoquímica**. Sin embargo, el advenimiento de la Segunda Guerra Mundial retrasó el uso de la técnica de anticuerpos fluorescentes, pero en los años de la posguerra, el interés por métodos de identificación rápida provocó grandes avances en la aplicación de los métodos de IF (Difco, 1965).

En 1958, con el uso del isotiocianato de fluoresceína, esta técnica resultó esencial para el diagnóstico y estudio etiopatogénico de numerosas enfermedades, debido a que combina la sensibilidad y especificidad de las reacciones inmunológicas, con la precisión topográfica de la microscopía óptica (Riggs, 1958).

A pesar de contar con importantes ventajas, la IF tiene algunas desventajas como son: el requerir de un microscopio especializado, personal entrenado y que las preparaciones no son permanentes. En consecuencia, fue necesario desarrollar nuevos métodos inmunohistoquímicos, que permitieran la localización al microscopio óptico de un antígeno en forma permanente, así como la visualización de la morfología tisular (Coons *et al.*, 1950, Benites y cols, 1982; Catty, 1990; Edwards, 1983; Reynolds, 1990).

En 1969, Nakane, Avrameas y Sternberger establecen la metodología para conjugar anticuerpos con enzimas y anticuerpos no marcados, con sustancias cromógenas, que permitieron la identificación de antígenos en cortes histológicos, por la formación de productos cromógenos permanentes, preservando un detalle morfológico excelente.

Las preparaciones obtenidas con las técnicas de inmunocitoquímica permiten el uso de microscopía óptica y pueden ser examinadas con microscopio electrónico, lo que permite extender considerablemente el campo de la inmunocitoquímica ultrestructural (Sternberger, 1970; Roszkowsky, 1978; Benites, 1982; Tijssen, 1985; Gay, 1986; Roy, 1986; Catty, 1990 y Haines and Chelack, 1991).

### **Aplicaciones de las técnicas inmunohistoquímicas.**

La especificidad y sensibilidad de las técnicas inmunohistoquímicas, han favorecido su implementación para el diagnóstico de algunas neoplasias a través de la identificación de biomarcadores, identificación de componentes que participan en reacciones de hipersensibilidad, identificación de células involucradas en procesos infecciosos específicos, identificación de toxinas micóticas, así como poner de manifiesto partículas virales, bacterias, hongos y protozoarios, en muestras de tejido fijadas en solución de formalina (Mckie and Young, 1984; Allan *et al.*, 1984; Meador, 1986; Bourgon, 1987; Narita, 1989; Haines and Chelack, 1991; Boone, 1994; Cartun, 1995; Johnson, 1999).

Rhodes, en 1986, proponía el uso de técnicas inmunohistoquímicas para estudios prospectivos y retrospectivos, hecho que ayudaría a redefinir la clasificación de lesiones y algunos casos la información etiológica podría conducir a una terapia rápida y específica.

Actualmente, los métodos de tinción inmunohistoquímica se usan tan ampliamente en la anatomía patológica diagnóstica y diversos campos de la investigación, que puede referirse a ellos como otra tinción especial, pero específica (Naish, 1989; Chandler, 1995; Leake, 2000; Abbas, 2002).

### **Clasificación de las técnicas inmunohistoquímicas.**

Las técnicas inmunohistoquímicas se clasifican con base en dos características:

#### 1. Método utilizado:

- Método directo,
- Método indirecto y
- Método del anticuerpo no marcado.

#### 2. Marcador de anticuerpos:

- Técnicas de inmunofluorescencia,
- Técnicas inmunoenzimáticas y
- Técnicas inmunometálicas.

Los marcadores pueden unirse al anticuerpo primario en el caso del método directo, o bien, al anticuerpo secundario en el método indirecto. En el método del anticuerpo no marcado, el marcador no se conjuga químicamente al anticuerpo, pero actúa como un antígeno, unido al anticuerpo en un complejo (Bancroft, 1994; Benites, 1982; Quezada, 1989; 1990).

### **1.7 Técnica de Inmunofluorescencia.**

La técnica de IF desarrollada por Coons en 1941, es un procedimiento que consiste en el marcaje de anticuerpos en forma estable con un colorante fluorescente (fluorocromo) para localizar antígenos tisulares (Riggs, 1958, Goldman 1968; Benites, 1982, Sheehan and Hrapchak, 1980). Esta técnica evolucionó en los años siguientes a la conclusión de la segunda guerra mundial, debido a factores tales como:

1. El uso de métodos de transportación rápida, que facilitó la introducción de enfermedades infecciosas en áreas que nunca las habían experimentado.

2. La introducción de terapias antibióticas que requieren el establecimiento de la identidad verdadera de un microorganismo y su susceptibilidad, previa a la administración del antibiótico de elección.
3. La evolución de antisueros específicos contra numerosos patógenos y el conocimiento de sus reacciones cruzadas.
4. La descripción de marcadores estables -isotiocianato de fluoresceína y de rodamina B-, hecha por Riggs en 1958 (Difco, 1965; Riggs y col, 1958).

### **Avances en los métodos de Inmunofluorescencia.**

1. El principal avance de las técnicas de IF sobre otros métodos, es la rapidez con la que se obtienen resultados. En algunos casos, la muestra puede ser examinada y proporcionar el resultado el mismo día que fue recibida.
2. En muchos casos los métodos de cultivo pueden ser eliminados o reducidos considerablemente.
3. El aislamiento de cultivo puro no es necesario.
4. Es fácil encontrar una pequeña cantidad de antígeno en una muestra clínica, aún cuando esta muestra contenga una gran cantidad de organismos contaminantes.
5. Las muestras inconvenientes para otras pruebas, que contengan patógenos no viables o patógenos de cultivo difícil, resultan adecuadas para la técnica de IF.
6. Es posible detectar organismos intracelulares por la técnica de IF.
7. Además de su uso en la identificación de microorganismos, la técnica de IF se aplica en la detección de antígenos solubles, la detección de proteínas estructurales y autoanticuerpos y para otros estudios, tales como sitio de formación de anticuerpos e hipersensibilidad.
8. La sensibilidad del método de IF es comparable en muchos casos con la de otras pruebas serológicas y en algunos casos, su sensibilidad y especificidad rebasan a los métodos convencionales.

9. Una vez que la técnica se ha aprendido, su elaboración en la rutina de trabajo, se torna sencilla.
10. Cuando se cuenta con el equipo básico, el costo por prueba es relativamente bajo (Difco, 1965).

Es importante hacer énfasis en que a pesar de los avances en la técnica de IF aún no es posible eliminar el cultivo convencional y los métodos serológicos. Debido a esto, la técnica de IF se ha establecido como un procedimiento alternativo en el laboratorio de serología (Difco, 1965).

### **Fundamento de las técnicas de Inmunofluorescencia.**

Las técnicas de inmunofluorescencia se basan en los fenómenos de **fotoluminiscencia**, los cuales consisten en la emisión de luz por un cuerpo bajo la acción de diferentes tipos de radiación. Cada sustancia fluorescente (fluorocromo) tiene su espectro de absorción y de emisión característico.

El rendimiento cuántico de un compuesto fluorescente es el cociente del número de *quantum* emitidos entre el número de *quantum* absorbidos, este valor siempre es menor de 1. En microscopía de fluorescencia conviene utilizar compuestos con rendimiento cuántico elevado. La fluoresceína, por ejemplo, tiene un valor de 0.70, mientras que la rodamina tiene un rendimiento de 0.25.

Los fluorocromos, son sustancias orgánicas que poseen dobles ligaduras conjugadas, a las que se debe la capacidad de fluorescer. Los fluorocromos más usados son el isotiocianato de fluoresceína (FITC), derivados de rodamina, naranja de acridina, sulfoflavina, etc.; estas sustancias tienen la capacidad de unirse a las moléculas tisulares sin alterar su estructura y se les puede utilizar para teñir en forma directa o conjugados, con anticuerpos (Goldman, 1968, Sheehan and Hrapchak, 1980).

Las técnicas de IF se aplican con mayor frecuencia sobre tejidos congelados y en tejidos fijados con formalina y embebidos en parafina. Los fluorocromos pueden unirse al anticuerpo primario en el caso del método directo o bien, al anticuerpo secundario en el método indirecto (Figuras 4 y 5).

Las técnicas de IF también se usan para identificar anticuerpos en tejidos y en suero (Goldman, 1968; Bancroft, 1982; Benites, 1982; Quezada, 1989 y 1990; Sheehan and Hrapchak, 1980).



Figura 4. Método de inmunofluorescencia directa (adaptado de Dako, 1997).



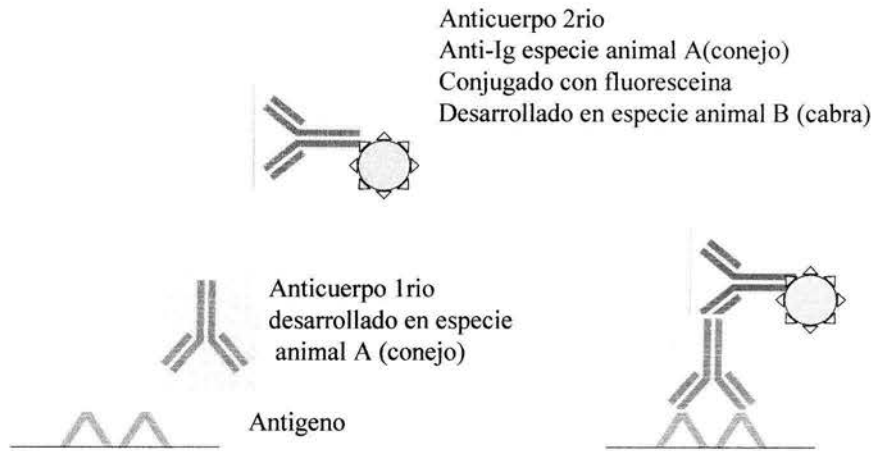


Figura 5. Método de inmunofluorescencia indirecta (adaptado de Dako, 1997).

Además, las técnicas de IF permiten el marcaje e identificación de dos antígenos distintos en la misma preparación. Para ello se marca un anticuerpo con rhodamina y otro con fluoresceína, se agregan en forma sucesiva sobre el espécimen, cuidando de evaluar a cada anticuerpo por medio de testigos (Riggs *et al.*, 1958; Goldman, 1968; Sheehan and Hrapchak, 1980).

La intensidad de la fluorescencia en una preparación depende de:

1. La eficiencia del fluorocromo para convertir la luz de excitación en fluorescente.
2. La concentración del fluorocromo en el tejido.
3. La intensidad de luz excitante (Goldman, 1968).

La observación de las preparaciones se efectúa en un microscopio de fluorescencia, este es un microscopio óptico que cuenta con una lámpara de mercurio de alta presión de halógeno o xenón, la cual funciona como fuente de luz ultravioleta. Los microscopios de fluorescencia pueden ser de luz transmitida o bien, epiiluminación y

ambos requieren del uso de dos filtros: el primario o excitador y el secundario o de barrera. Estos filtros se seleccionan de acuerdo al espectro de luz del fluorocromo utilizado (Goldman, 1968).

### **1.8 Técnicas inmunohistoquímicas.**

Las técnicas inmunohistoquímicas son de gran utilidad para la confirmación de un diagnóstico, especialmente cuando sólo se cuenta con material fijado. En casos sospechosos de infección viral, las técnicas inmunohistoquímicas son particularmente útiles cuando los cuerpos de inclusión no pueden detectarse con tinciones convencionales o cuando los cuerpos de inclusión son morfológicamente atípicos (Chandler, 1995).

Existen varios métodos inmunoenzimáticos, la elección del método a usar depende fundamentalmente del número de anticuerpos a usar y el tipo de anticuerpo con que se cuente. Los métodos inmunohistoquímicos de mayor uso son: el método directo, el indirecto y el de inmunoperoxidasa.

En el **método directo** se usa un anticuerpo primario marcado con una enzima, dicho anticuerpo es específico contra el antígeno de interés (Figura 6). Este método tiene la ventaja de ser fácil de desarrollar y barato. Sin embargo, es poco sensible y su uso se restringe a la detección de ciertos antígenos, además de que es necesario conjugar cada antisuero primario a una enzima.

El **método indirecto** usa un anticuerpo secundario anti-inmunoglobulina, conjugado con una enzima. El anticuerpo secundario detecta uniones entre el anticuerpo primario y el tejido problema (Figura 7). Aunque este método es más complejo que el directo, resulta más sensible y no requiere de la conjugación de cada anticuerpo primario. Otra ventaja que tiene este método es que los anticuerpos secundarios están disponibles comercialmente y pueden ser usados en combinación con múltiples anticuerpos primarios (Benites, 1982; Haines and Chelack, 1991; Quezada, 1989; Sheehan and Hrapchak, 1980). Sin embargo, tiene la desventaja de requerir de un anticuerpo secundario y por lo tanto cuenta con una variable más

a controlar. Una alternativa conveniente a este método es el uso de Streptavidina, que reacciona con anticuerpos primarios elaborados en la mayoría de las especies de mamíferos y puede ser conjugado fácilmente con la peroxidasa. En muchos casos la Streptavidina-peroxidasa ha mostrado mayor especificidad que el uso de anticuerpos anti IgG marcados (Dubois-Daldq, 1977), especialmente en tejidos que contienen receptores Fc (Tijssen,1992).

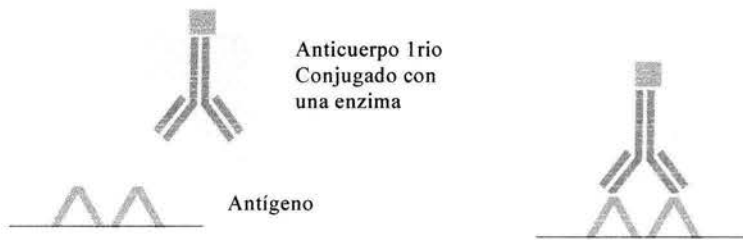


Figura 6. Método de inmunohistoquímica directa (adaptado de Dako, 1997).

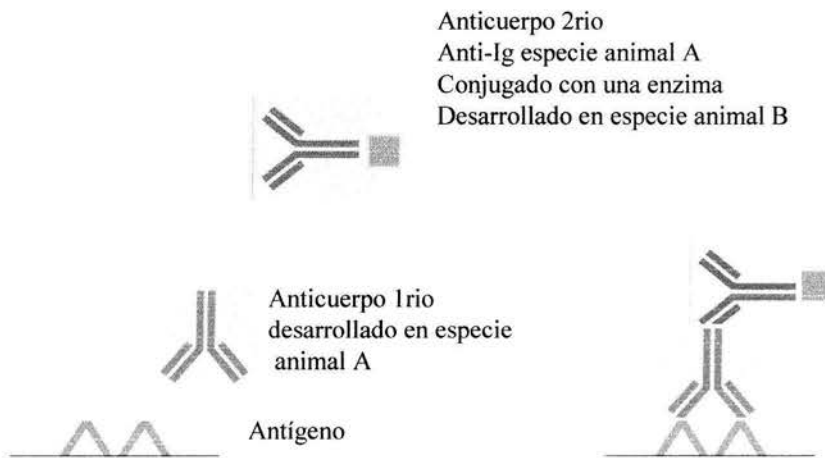


Figura 7. Método de inmunohistoquímica indirecta (adaptado de Dako, 1997).

El método de **anticuerpo no marcado**, desarrollado simultáneamente por Mason *et al.* y Sternberger en 1969, se le conoce también como el método del puente o de tres capas. Este consiste en la aplicación secuencial de tres anticuerpos. El anticuerpo primario (Ac-1), está dirigido contra el antígeno problema; el secundario (Ac-2), es elaborado contra el anticuerpo primario, en una especie animal distinta y el terciario (Ac-3), es elaborado contra la peroxidasa en la misma especie animal que el anticuerpo primario. De esta manera, el Ac-2 se une por su fragmento Fab al Fc del Ac-1 y el Ac-3 se une por su Fc al Ac-2, dejando libres sus fragmentos Fab, cuyas porciones variables están estereoquímicamente estructuradas contra la peroxidasa. Así, finalmente se agrega la Peroxidasa que se unirá a los Fab del Ac-3, para finalmente, aplicar el cromógeno que revelará la enzima (Figura 8) (Tijssen, 1992; Sternberger *et al.*, 1970). Modificaciones a esta técnica dieron lugar al desarrollo de las técnicas de peroxidasa anti-peroxidasa (PAP), Complejo avidina-biotina-peroxidasa (ABC) y sus variaciones, para mejorar la sensibilidad y especificidad (Tijssen, 1992).

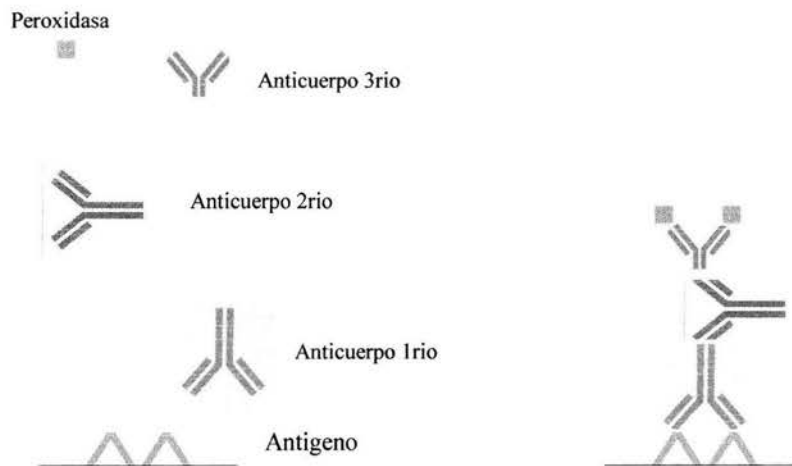


Figura 8. Método del anticuerpo no marcado (adaptado de Dako,1997).

Los sistemas de detección por inmunoperoxidasa más usados son el Complejo avidina-biotina-peroxidasa (ABC), peroxidasa anti- peroxidasa (PAP) y el de Streptoavidina-biotina (BSA). En Europa se usan más los métodos basados en el uso de fosfatasa alcalina (Benites, 1982; Taylor, 1986). El resultado final, en estas técnicas, da lugar a un anticuerpo unido a la peroxidasa. La peroxidasa unida al peróxido de hidrógeno, reacciona con un cromógeno, produciendo una coloración. Esta tinción representa sitios antigénicos específicos en el tejido o las células.

El sistema **Peroxidasa-anti-Peroxidasa** (PAP). En esta técnica el anticuerpo secundario funciona como anticuerpo puente entre el anticuerpo primario y el complejo PAP. El anticuerpo puente puede ser un antisuero elaborado en la misma especie que el complejo PAP. Finalmente, las moléculas de peroxidasa expuestas reaccionan con cromógenos en presencia de peróxido de hidrógeno. El resultado es positivo si al observar al microscopio las preparaciones incubadas con suero hiperinmune, se aprecian células teñidas con un pigmento café ocre en el citoplasma o el núcleo (Figura 9). (Tijssen, 1992; Sheehan and Hrapchak, 1980).

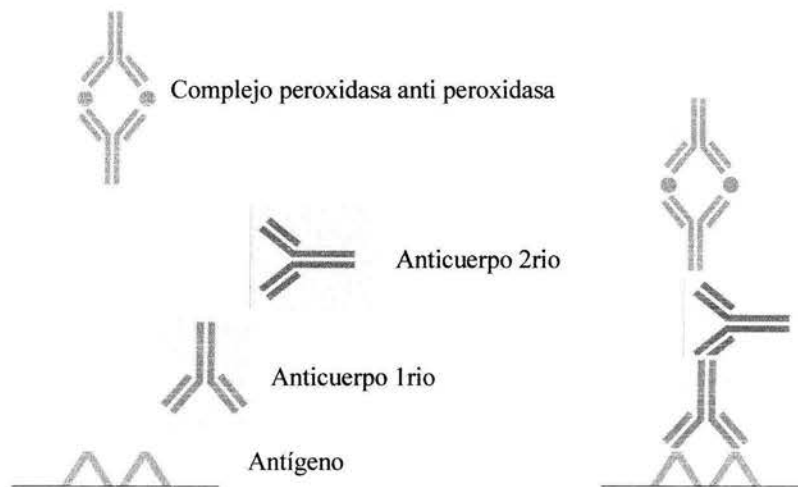


Figura 9. Método de peroxidasa anti peroxidasa (adaptado de Dako, 1997).

**El Complejo Avidina-Biotina**, se basa en el uso de la avidina, una glicoproteína del huevo, que posee cuatro sitios activos de unión para la biotina (una vitamina hidrosoluble). Por lo tanto, la avidina es extraordinariamente afín a las moléculas biotinadas como los anticuerpos y la peroxidasa de raíz de rábano fuerte. El resultado final será la formación de complejos altamente estables que contengan múltiples moléculas de peroxidasa (Benites, 1982). Los sitios inmunorreactivos en los tejidos y células son detectados usando anticuerpos específicos, dirigidos contra polipéptidos virales o proteínas celulares (Haines and Chelack, 1991; Reynolds and Nelson, 1990). Estos anticuerpos pueden ser monoclonales o policlonales (Reynolds and Nelson, 1990). La especificidad del anticuerpo reduce de manera importante la presencia de uniones inespecíficas (Ducatelle *et al.*, 1985; Reynolds and Nelson, 1990).

**El método de biotina streptavidina.** La streptavidina es una molécula purificada a partir de *Streptomyces avidinii*. Esta molécula es homotetrámera, lo que le otorga la capacidad de unirse a cuatro moléculas de biotina a través de uniones no covalentes (Figura 10). Además, la streptavidina tiene dos sitios reactivos que le permiten ligar a dos inmunoglobulinas, como anticuerpo puente, con la ventaja adicional de que puede actuar entre IgG de dos diferentes especies. De esta manera se elimina el requisito de que los anticuerpos del complejo PAP deben ser producidos en la misma especie que el anticuerpo primario. Las preparaciones procesadas con streptavidina tienen menor reacción de fondo que aquellas procesadas con avidina (Sigma, 2001; Anónimo, 1988; Tijssen, 1992).

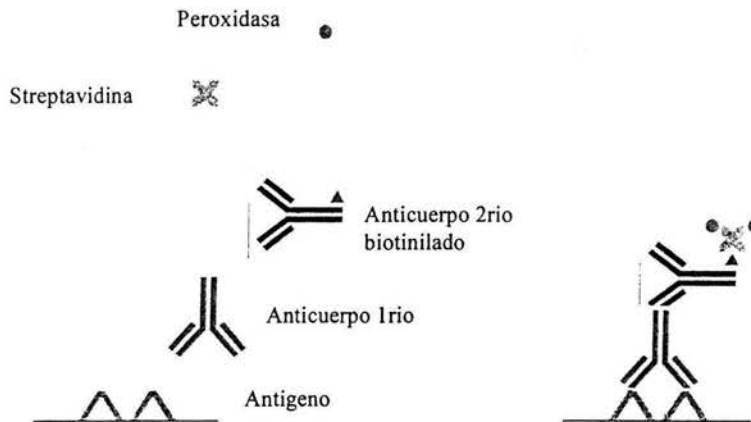


Figura 10. Método de biotina-streptavidina (adaptado de Dako, 1997).

### **Cromógenos.**

Todas las técnicas inmunohistoquímicas se basan en la exposición del antígeno a demostrar, frente a un anticuerpo específico; lo anterior produce una unión antígeno-anticuerpo, la cual es altamente selectiva.

Para localizar al complejo inmune, es necesario "marcarlo" con algún producto visible al microscopio, por ejemplo un cromógeno, mediante técnicas directas o indirectas (Quezada *et al.*, 1990). Los marcadores o cromógenos que se usan con mayor frecuencia son: moléculas fluorescentes (fluorocromos), enzimas (peroxidasa, fosfatasa alcalina) y metales (oro coloidal con o sin nitrato de plata). (Bancroft *et al.*, 1994; Benites, 1982; Quezada y cols., 1989, 1990).

La reacción que ocurre a nivel histoquímico puede ser resumida en la siguiente ecuación:



Figura 11. Ecuación que describe la oxidación de un cromógeno.

El cambio molecular en el cromógeno oxidado tiene como consecuencia un producto de reacción insoluble en solventes orgánicos, que difiere del color del compuesto inicial. Esta propiedad de los cromógenos, aunada a la disponibilidad de varios tipos de ellos, permiten la identificación secuenciada o simultánea de antígenos, en el mismo corte histológico (Benites, 1982; Tijssen, 1985; Bancroft *et al.*, 1994).

Entre los cromógenos usados con mayor frecuencia en inmunohistoquímica, se encuentran: i) el 3,3' diaminobenzidina (DAB), ii) el 3 amino-9 etilcarbazol (AEC), iii) la ortodianizidina y iv) la ortofenilendiamina (OPD). Estos productos son potencialmente carcinogénicos por lo que deben ser manipulados con precaución (Reynolds and Nelson, 1990). Otros cromógenos, menos peligrosos son: el 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB), el cromógeno de Hanker-Yates y el 4-cloro-1-naphthol (CN) (Tijssen, 1985).

### **Aplicaciones de las técnicas inmunohistoquímicas.**

En Medicina Veterinaria, las técnicas de inmunohistoquímica se han implementado para el diagnóstico de algunas enfermedades. La mayoría de las investigaciones refieren el uso de tejidos fijados y embebidos en parafina, debido al interés de conservar la morfología celular. Tal es el caso de los trabajos realizados por Ducatelle *et al.* (1985), quienes efectuaron tinciones con hematoxilina o ácido



periódico de Schiff, sobre secciones de tejido previamente teñidas mediante la técnica de inmunoperoxidasa, para estudiar de manera comparativa las lesiones y focos de multiplicación viral en el mismo corte. Por su parte, Narita *et al.* (1989), a través del uso de técnicas inmunohistoquímicas, demostraron la presencia del virus de Aujeszky en tejido cerebral y linfóide embebido en parafina, en el cual se habían observado lesiones sugestivas de la enfermedad, al ser teñidos con hematoxilina-eosina.

A pesar de los ejemplos antes descritos, pocos anticuerpos reaccionan bien en tejidos fijados con formaldehído amortiguado, al 10% (Bourgon and Charlton, 1987; Reynolds and Nelson, 1990). Esto se debe a la habilidad que tiene la formalina de reaccionar con proteínas formando grupos hidroximetilo activos, ésta es una de sus propiedades más importantes como fijador y el principal inconveniente en inmunohistoquímica, ya que provoca un efecto de enmascaramiento antigénico (Puchtler and Meloan, 1985). Por lo que se recomienda que el proceso de fijación se efectúe completa y rápidamente (Tijssen, 1985; Taylor, 1986).

Con el fin de incrementar la inmunorreactividad de antígenos virales, en tejidos fijados y embebidos en parafina, resulta necesaria la aplicación de un método de desenmascaramiento antigénico; es decir, romper las uniones entre la molécula de formalina y el antígeno, para de esta manera exponer los determinantes antigénicos presentes en la muestra (Mason and O'Leary, 1991; Chandler, 1995). Entre los diferentes métodos de desenmascaramiento o recuperación antigénica propuestos, destacan la utilización de enzimas proteolíticas, llamada digestión enzimática, y la aplicación de calor. El uso de la digestión enzimática se restringe a un número pequeño de antígenos y con resultados limitados (Taylor, 1985; Battifora, 1992).

La recuperación antigénica a través del sobrecalentamiento de cortes de tejido en un horno de microondas, puede incrementar la inmunotinción de algunos agentes infecciosos; debido al bajo costo que representa y los buenos resultados que se obtienen a partir de su utilización, esta técnica es la más común en los laboratorios

de diagnóstico (Shi *et al.*, 1991; Cattoretti *et al.*, 1993; Norton, 1993, Norton *et al.*, 1994; Chandler, 1995).

Otro método de reciente desarrollo es el uso de amplificadores de la reacción avidina-biotina. Esta metodología consiste en el uso de tiramida biotinada, la cual funge como intermediario entre el conjugado y ciertas partículas proteicas, por lo que su uso está indicado en la detección de secuencias de ácidos nucleicos específicas, en infecciones virales latentes, translocaciones cromosómicas y mapeo genético (Tani *et al.*, 1996).

Existen otros sistemas de reconocimiento molecular no inmunológico que contribuyen a incrementar la aplicabilidad de las técnicas inmunoenzimáticas, tales como la proteína A y las lectinas (Abbas *et al.*, 2002).

#### **Técnicas inmunometálicas.**

Estas técnicas consisten en el uso de anticuerpos unidos a sondas electrodenas, como el oro coloidal, para determinar la localización del anticuerpo a nivel subcelular, que ha dado origen a la **microscopía inmunoelectrónica**.

Se han utilizado partículas de oro de diferentes tamaños para la localización simultánea de varios antígenos a nivel ultraestructural. Estas reacciones, pueden además, ser amplificadas con plata. Las tinciones de inmunooro-plata se han usado en tejidos embebidos en parafina, en combinación con técnicas inmunohistoquímicas y aún con técnicas histoquímicas, con el objetivo de intensificar estas reacciones (Abbas *et al.*, 2002; Bruce, 1987; Hayat, 1993).

Con base en lo anterior, se concluye que debido a las numerosas ventajas que ofrecen las técnicas inmunohistoquímicas, para determinar la presencia de un antígeno específico en tejidos, ya sean frescos, o fijados y embebidos en parafina, es viable su implementación para el diagnóstico de la Enfermedad de Ojo Azul.

## JUSTIFICACIÓN

A pesar de que se han descrito las lesiones microscópicas de la infección por el *Rubulavirus* porcino de la Enfermedad del Ojo Azul en el sistema nervioso central (SNC) de animales en experimentación y de campo, su distribución topográfica a diferentes intervalos de tiempo, en lechones de tres a nueve días de edad, aún no se ha definido. Esto último podrá explicar la presentación de los signos clínicos que se presentan en brotes de la enfermedad.

Por lo anterior, este trabajo aportará información relevante que complemente la patogenia de la enfermedad a través de la implementación de técnicas con alta sensibilidad y especificidad, como las de inmunohistoquímica. Asimismo, el establecimiento de estas técnicas servirá para el diagnóstico preciso, rápido y a bajo costo, de la EOA en los diferentes Laboratorios de diagnóstico.

## HIPÓTESIS

El uso de técnicas inmunohistoquímicas (inmunofluorescencia e inmunoperoxidasa), permitirá definir la distribución topográfica del *Rubulavirus* porcino en encéfalo de cerdos de tres a nueve días de edad, inoculados experimentalmente.

Las técnicas inmunohistoquímicas (inmunofluorescencia e inmunoperoxidasa) son un método diagnóstico sensible y rápido.

## OBJETIVO GENERAL

Determinar la distribución topográfica del *Rubulavirus* porcino en encéfalos de cerdos de tres a nueve días de edad, a través del uso de técnicas inmunohistoquímicas, y su relación con la signología clínica observada en estos casos.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Establecer y estandarizar dos técnicas inmunohistoquímicas (inmunofluorescencia e inmunoperoxidasa) para el diagnóstico de la enfermedad de ojo azul.
- Comparar la sensibilidad de dos técnicas inmunohistoquímicas (inmunofluorescencia e inmunoperoxidasa) para el diagnóstico de la enfermedad de ojo azul.
- Conocer sobre la patogenia de la enfermedad de ojo azul, a través de la revisión de su inmunolocalización, en encéfalos de cerdos de tres a nueve días de edad, inoculados experimentalmente.
- Asociar la distribución topográfica del virus de EOA en encéfalo de cerdos de tres a nueve días de edad, con la signología clínica observada.

## Capítulo 2

### 2. MATERIAL Y MÉTODOS

#### 2.1 Inóculo viral.

Se usó un inóculo de *Rubulavirus* porcino obtenido a partir de un aislamiento de cerdos clínicamente enfermos, a este primoaislamiento se le denominó cepa Pac3. La identidad y pureza del inóculo se determinaron a través de la prueba de virusneutralización (Burleson *et al.*, 1992). Para replicar al agente infeccioso, se inocularon dos lechones de siete días de edad, mismos que fueron sacrificados en estado agudo de la enfermedad y se extrajo el encéfalo de cada animal, estos fueron fragmentados y colocados en viales para conservarles en un tanque con nitrógeno líquido hasta el momento de ser utilizados. Para este estudio, una porción de dichos encéfalos, fue macerada con medio esencial mínimo (MEM), sin suero fetal bovino y suplementado con penicilina (100U/mL) y estreptomina (100µg/mL). El material obtenido fue centrifugado a 3,500 r.p.m. durante 15 minutos y filtrado a través de una membrana Millipore de 0.22 µm. Con el filtrado, se inocularon monoestratos de células de riñón de mono verde (células VERO), esperando observar indicios de efecto citopático en ellas (vacuolización del citoplasma, necrosis o formación de sincitios), 48 horas p.i. (Moreno-López *et al.*, 1986; Reyes L. *et al.*, 1993). Posteriormente se procedió a congelar y descongelar dichos monoestratos, con el objetivo de provocar lisis celular y en consecuencia, la liberación de partículas virales. El líquido sobrenadante fue titulado a través de la prueba de hemoaglutinación, obteniendo un título de 32 unidades hemoaglutinantes (UHA).

A continuación, se efectuaron diluciones dobles en solución amortiguada de fosfatos (PBS), (50 µL de virus en suspensión y 50 µL de PBS), misma que fue centrifugada a 2,000 rpm durante cinco minutos. Finalmente, se recuperó el sobrenadante, el cual fue titulado a través de la prueba de hemoaglutinación, obteniendo un título de 1:16 UHA (Burleson *et al.*, 1992; Ramírez y cols., 1996). El *Rubulavirus* porcino

propagado en cultivo de células PK15, con un título de  $1 \times 10^7$  TCID<sub>50</sub> /mL (Moreno-López *et al.*, 1986; Hernández y col., 1994; Reyes L. *et al.*, 1993).

El sobrenadante fue fraccionado en 18 alícuotas de 6 mL y una de 3 mL, mismas que se consideraron como dosis de inoculación para la elaboración del anticuerpo policlonal en conejos y para los lechones del grupo experimental.

Para corroborar la autenticidad del inóculo, se efectuó la técnica transcriptasa inversa de reacción en cadena de la polimerasa (RTPCR) (Wagstrom, 2000)

## 2.2 Anticuerpo policlonal.

Para las técnicas inmunohistoquímicas se elaboró un anticuerpo policlonal contra el virus de la EOA. elaborado en conejo (Sundqvist *et al.*, 1990). Para lo cual se procedió a hiperinmunizar a cuatro conejos machos, raza Nueva Zelanda, utilizando la vía intramuscular, intercalada con inoculaciones endovenosas, como refuerzo, siguiendo la metodología descrita por Harlow y Lane (1988) (Gavilondo, 1995).

Semana	Vía de inoculación	Dosis
1	intramuscular	2 mL
2	endovenosa	2 mL
3	intramuscular	2 mL
4	endovenosa	2 mL
5	intramuscular	2 mL
6	intramuscular	2 mL

Figura 12. Esquema de inoculación de conejos para la obtención de anticuerpos policlonales contra el *Rubulavirus* porcino.

En la cuarta inoculación, los cuatro conejos fueron sangrados para evaluar el título de anticuerpos, mediante la técnica de inhibición de la hemoaglutinación (IH) (Ramírez y cols., 1996). Los títulos obtenidos fueron 1:4 y 1:8.

Al concluir el esquema de inoculación, se procedió a sangrar a los conejos por vía intracardiaca, para obtener posteriormente el suero de esta sangre con el método descrito por Harlow and Lane (1988).

El suero obtenido de los cuatro conejos fue titulado mediante la técnica de inhibición de la hemoaglutinación (IH) (Ramírez y cols., 1996). A partir de la titulación de estos sueros, se eligieron aquellos con título mayor (1:32 y 1:64), mismos que posteriormente serían concentrados a través de adición de una solución saturada de sulfato de amonio y purificada a través de un proceso de diálisis (12,400 PM), con el objetivo de disminuir reacciones inespecíficas en las técnicas inmunohistoquímicas (Harlow and Lane, 1988).

Una vez purificados los sueros, fueron titulados nuevamente con el método de inhibición de la hemaglutinación, obteniendo un título de 1:128. Se determinó la cantidad de aminoácidos aromáticos (triptofano, tirosina y fenilalanina) a partir del método de Biuret, en un espectrofotómetro automatizado, marca Roche, modelo cobasmira; con el objetivo de cuantificar la cantidad de proteínas totales presentes en el suero hiperinmune, la cual dio como resultado una lectura de 33 g/L. El suero purificado fue adicionado con azida de sodio al 0.02% para prevenir su contaminación por bacterias u hongos. De esta manera, el suero fue dividido en alícuotas de 10 mL y almacenado a -70°C, hasta el momento de su uso (Harlow and Lane, 1988).

### **2.3 Instalaciones.**

Los lechones fueron alojados en las áreas de aislamiento que pertenecen al DPA:C, en la FMVZ-UNAM. Las tres áreas de aislamiento están divididas en dos corrales cada una. Cada corral tiene una lechonera de concreto, a la cual se adicionó una lechonera de madera (82 cm de largo, 60 cm de ancho y 64 cm de alto, entrada 42 X 42 cm) con foco al techo como fuente de calor y se agregó viruta sobre el piso para brindar un ambiente cómodo a los animales.



## 2.4 Unidades experimentales.

Los animales que se usaron en este estudio fueron 36 lechones híbridos de dos días de edad, hembras y machos, provenientes de una granja cuyo hato es libre de enfermedades como: EOA, enfermedad de Aujeszky, FPC y GET (Allan *et al.*, 1996). Los lechones fueron transportados de la granja hasta las instalaciones del DPA: C, FMVZ- UNAM, en cajas de cartón con viruta.

## 2.5 Grupos de estudio.

El grupo experimental estuvo formado por 30 lechones, organizados en forma aleatoria en subgrupos de 10 animales. El grupo testigo estaba formado por seis lechones, que recibieron tratamiento semejante, excepto la inoculación del antígeno viral, los cuales fueron sacrificados en los mismos intervalos de tiempo que los lechones del grupo experimental (figura 13).

Previo a la inoculación, se tomaron muestras de sangre (3 mL), tanto de los lechones del grupo experimental como los del grupo testigo, para detectar anticuerpos en el suero contra el *Rubulavirus* porcino, usando la prueba de inhibición de la hemaglutinación (IH) (Ramírez y cols., 1996).

El día de su llegada, los lechones del grupo experimental fueron inoculados individualmente con una dosis infectante del *Rubulavirus* porcino. A cada cerdo se le administraron 2 mL de inóculo por vía intranasal y 1 mL por vía intramuscular, en el músculo gastrocnemio medial (Visuet, 1995; Visuet *et al.*, 1996; Stephano y cols., 1988; Ramírez-Herrera y cols., 1997).

Los lechones tanto del grupo experimental, como del grupo testigo, fueron alimentados con una fórmula láctea por medio de biberones, cada dos horas los

primeros tres días y cada cuatro horas los siguientes cuatro días; cubriendo de esta manera sus requerimientos nutricionales.

Antes de sacrificar a los lechones, tanto los del grupo experimental como los del grupo testigo, se tomaron muestras de sangre (3 mL) para detectar anticuerpos en suero sanguíneo contra el *Rubulavirus* porcino, usando la prueba de IH (Ramírez y cols., 1996).

### **Inspección clínica.**

Diariamente, a partir de la fecha de inoculación, se registraron en una hoja de campo los signos clínicos que manifestaron los lechones; tales como comportamiento social y observaciones clínicas (Pradal, 1994).

### **Obtención de muestras.**

Los animales fueron sacrificados, en forma humanitaria, con sobredosis de pentobarbital sódico 0.63%, por vía intracardiaca (Taylor, 1999; Plumb, 1999; Aluja y Constantino, 2002); en grupos de 5 animales, a intervalos de 1, 3, 4, 5, 6 y 7 días post-inoculación (Pérez y cols., 1988; Stephano *et al.* 1988) (Figura 13).

Fecha de sacrificio	Día 1 p.i.	Día 3 p.i.	Día 4 p.i.	Día 5 p.i.	Día 6 p.i.	Día 7 p.i.	Total de animales
Grupo experimental	5	5	5	5	5	5	30 animales
Grupo testigo	1	1	1	1	1	1	6 animales
Total	6	6	6	6	6	6	36 animales

Figura 13. Descripción de los diferentes grupos de sacrificio.

En cada caso, una vez sacrificado el lechón, se procedió a extraer el encéfalo y la porción más proximal de la médula espinal cervical (Straw and Meuten, 1993), dividiendo el cerebro en hemisferio derecho e izquierdo.

El cerebelo, tronco encefálico y médula espinal cervical proximal fueron divididos por la mitad sobre su eje longitudinal. Se efectuaron tres cortes coronales sobre uno de los hemisferios cerebrales, uno sobre cerebelo y médula espinal cervical; para posteriormente colocarlos en solución de formalina amortiguada, al 10%, durante 12 a 18 horas para la adecuada conservación de la morfología del tejido (Naish, 1989; Sandusky and Wightmain, 1985).

Debido a la alta capacidad que tiene el formol a formar grupos hidroximetilo, la formalina fue retirada y en su lugar se colocó etanol al 70 % (Battifora, 1992).

## 2.6 Procesamiento de las muestras.

A partir de las muestras fijadas de encéfalo, cerebelo y médula espinal cervical, proximal, se obtuvieron diez cortes seriados (Figura 14).

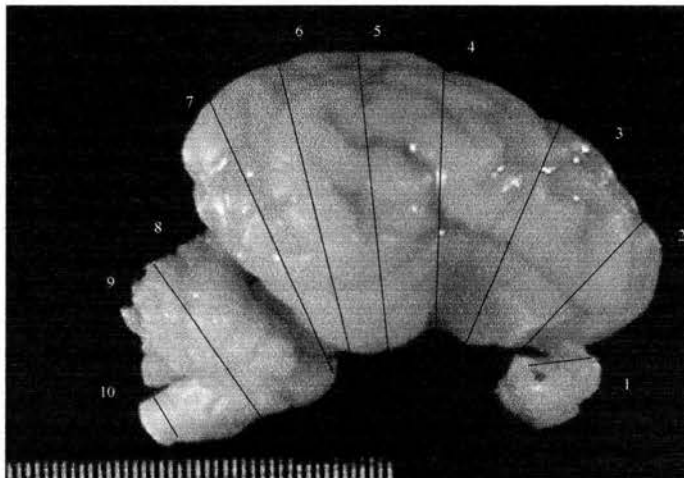


Figura 14. Niveles de corte en encéfalo.

Las áreas incluidas en cada sección de encéfalo fueron las siguientes (Afifi y Bergman, 2001; Sánchez y Lawzerwisch, 1984):

Corte	Sisura o giro	Estructuras anatómicas	Regiones
1		Bulbo olfatorio	(Rinencéfalo) Telencéfalo
2	Sisura presilviana	Lóbulo frontal	Telencéfalo
3	Giro cruciforme	Lóbulo frontal	Telencéfalo y parte olfatoria de ventrículo lateral
4	Sisura de Silvio	Lóbulo parietal	Telencéfalo , Diencefalo
5	Inicio de la sisura ectosilviana	Lóbulos parietal y temporal	Telencéfalo, Diencefalo
6	Sisura ectosilviana	Lóbulo temporal y piriforme	Telencéfalo, Diencefalo, Mesencefalo y parte límbica del rinencéfalo
7	Sisura suprasilviana caudal	Lóbulo occipital	Telencéfalo
8		Cerebelo y Puente	Metencefalo
9		Cerebelo y Médula oblongada	Metencefalo y Mielencefalo
10		Médula espinal, porción cervical	Médula espinal

Figura 15. Descripción de los diferentes niveles de corte efectuados en encéfalo

Estas secciones fueron procesadas en un histoquinette (Marca Sakura, modelo RH12EP), a través de la técnica de rutina.

Se obtuvieron cuatro cortes histológicos seriados, de 5  $\mu\text{m}$  de grosor; dos de ellos se colocaron sobre portaobjetos sin tratamiento de adhesivo, para su procesamiento con las técnicas de hematoxilina-eosina y Metil verde pironina (Hall *et al.*, 1995; Bancroft *et al.*, 1994, García, 1995) y los dos restantes, en portaobjetos silanizados, para su procesamiento con las técnicas de streptavidina-biotina-peroxidasa e inmunofluorescencia indirecta con la técnica de Auramina-rhodamina (Sheehan, 1980; Scheuer and Chalk, 1986).

El anticuerpo policlonal se utilizó a una dilución de 1:100 para la técnica de inmunofluorescencia indirecta y 1:1200 para la técnica de streptavidina-biotina-peroxidasa.

Los cortes histológicos procesados con la técnica de streptavidina-biotina-peroxidasa, fueron contrastados con hematoxilina de Harris.

### **Evaluación microscópica.**

Los tejidos embebidos en parafina y teñidos con la técnica de hematoxilina-eosina, fueron observados a través de un microscopio óptico (Marca Zeizz, con fuente de luz integrada, modelo K4), utilizando los objetivos 4x, 10x y 40x.

En el examen microscópico de estos cortes se evaluaron las siguientes lesiones: edema, gliosis, satelitosis, neuronofagia, degeneración neuronal y cuerpos de inclusión.

El resultado de cada observación se registró con un sistema semicuantitativo, como se describe a continuación:

- Edema: Se asignó 1, cuando se encontró separación de leptomeninges; 2, si se observaban hilos de fibrina en meninges y espacio perivascular y 3, con presencia de material eosinofílico entre leptomeninges o espacio perivascular.
- Gliosis: Se asignó 1, cuando se observó incremento en la población de células gliales; 2, con la presencia de microgliosis difusa y 3, cuando se encontraron nódulos gliales (Carlton and McGavin, 1995).
- Satelitosis: Se asignó 1, con presencia de dos a tres células gliales alrededor de un soma neuronal, por campo seco débil; 2, cuando se observaron dos a tres células gliales alrededor de dos o tres somas neuronales, por campo seco débil y 3, cuando se encontraron de dos a tres células gliales alrededor de cuatro o más somas neuronales, por campo seco débil.
- Neuronofagia: Se asignó 1, cuando se observaron dos a tres células al rededor de un soma neuronal, por campo, seco débil, con pérdida del citoplasma neuronal; 2, con presencia de dos a tres células al rededor de dos o tres somas

neuronales, por campo, seco débil, con pérdida del citoplasma neuronal y 3, cuando se encontraron de dos a tres células alrededor de cuatro o más somas neuronales, por campo seco débil, con pérdida del citoplasma neuronal.

- Degeneración neuronal: Se asignó 1, cuando se observaron dos a tres células por campo, seco débil, con material hialino basófilo en citoplasma; 2, con presencia de tres o cuatro células con material hialino basófilo en citoplasma, el núcleo y nucleolo no son aparentes, por campo, seco débil y 3, cuando se encontraron cuatro o más células por campo, seco débil, con material hialino basófilo en citoplasma, el núcleo y nucleolo no son aparentes.
- Cuerpos de inclusión: Se asignó 1, cuando se observó una célula por campo, seco fuerte, con cuerpos de inclusión intracitoplasmáticos, únicos o múltiples; 2, con presencia de dos células por campo, seco fuerte, con cuerpos de inclusión intracitoplasmáticos y 3, cuando se encontraron más de dos células por campo, fuerte, con cuerpos de inclusión intracitoplasmáticos.

Los cortes histológicos teñidos con la técnica de Metil verde pironina, fueron observados a través de un microscopio óptico (Marca Zeizz, con fuente de luz integrada, modelo K4). Esta tinción permite diferenciar entre estructuras constituidas por DNA o RNA (García, 1995). En el examen microscópico de estos cortes se evaluó la presencia de estructuras redondas de localización intracitoplasmática, en cuerpos neuronales, teñidas en rojo, compatibles con cuerpos de inclusión.

El resultado de esta observación fue descrito como positivo (+) o negativo (-).

Los cortes embebidos en parafina y procesados con la técnica de inmunohistoquímica, fueron observados a través de un microscopio óptico (Marca Zeizz, con fuente de luz integrada, modelo K4), en busca de inmunopositividad, que se caracteriza por la presencia de gránulos café ocre en el citoplasma de las células.

Las imágenes de éstas reacciones fueron capturadas a través de un fotomicroscopio (Marca Leica, con programa de procesamiento de imágenes "Sincroscoy").

Los resultados de estas observaciones se registraron como positivas (+) o negativas (-), identificando la lámina celular y núcleos cerebrales en los que se localizaban. Los campos descritos como positivos, se clasificaron de acuerdo al número de células con reacción positiva como: 1, cuando se observó reacción positiva en una a dos células, por campo seco fuerte; 2, con presencia de reacción en tres a cuatro células y 3, cuando se encontró reacción en más de cuatro células por campo seco fuerte.

Los cortes embebidos en parafina y procesados con la técnica de inmunofluorescencia, fueron observados a través de un microscopio invertido, (Marca Nikon, modelo TMD 300), equipado con un sistema de escaneo por láser MCR 1024 Bio-Rad y un láser enfriado por aire Ar Kr/Ar, para la obtención de imágenes confocales. Las imágenes fueron obtenidas con el objetivo Nikon 40x en inmersión. El tejido teñido con la técnica de Auramina-rhodamina, fue excitado con un láser de 48 nm, el haz de luz emitido fue pasado a través de un filtro de 522 a 532 dioptrías.

En estos cortes se buscó reacción positiva, que se caracterizó por la presencia de material granular rojo brillante en el citoplasma de las células. Las imágenes de estas reacciones fueron procesadas y convertidas a formato TIFF con el programa *Asistente Confocal de Todd Clark* (Cifuentes, 2001).

Los resultados de estas observaciones se registraron como positivas y negativas, identificando el área y cuando era posible, la capa celular y núcleos cerebrales involucrados. Los campos descritos como positivos, se clasificaron de acuerdo al grado de células con positividad: Se asignó 1, cuando se observó reacción positiva en una a dos células por campo seco fuerte; 2, con presencia de reacción en tres a cuatro células y 3, cuando se encontró reacción en más de cuatro células por campo, seco fuerte.

De éste modo se elaboraron cuadros en los que se relacionaron las láminas corticales, la citoarquitectura y los hallazgos histológicos de los diferentes procedimientos de tinción y marcaje.

Los resultados obtenidos a partir del uso de las técnicas inmunohistoquímicas fueron evaluados estadísticamente a través de una prueba de Xi cuadrada con el programa SPSS (Daniel, 1991)



## Capítulo 3

### 3. RESULTADOS

#### Inspección clínica.

Diariamente, a partir de la fecha de inoculación, se registraron de manera individual, los signos clínicos que manifestaron los lechones; tales como comportamiento social y observaciones clínicas.

- Primer día post inoculación, los cerdos del grupo experimental, mostraron buen comportamiento durante el primer día post inoculación.
- Segundo día post inoculación, se observaron numerosas peleas y diez cerdos mostraron edema palpebral e hiperemia conjuntival.
- Tercer día post inoculación, se observaron cinco cerdos con parálisis flácida de miembros posteriores (diplejía).
- Cuarto día post inoculación, se apreciaban seis cerdos con desplazamiento en círculos e incoordinación. Seis animales estaban postrados, mismos que presentaban movimientos coreicos (movimientos de carrera) y depresión; dos de ellos mostraron opacidad corneal, unilateral; uno de los cuales presentó hipotermia y coma.
- Quinto día post inoculación, 5 animales que habían estado postrados el día anterior, presentaban disfagia (ya no deglutían el alimento), parálisis flácida, hipotermia y coma.
- Sexto día post inoculación, los cerdos restantes mostraban parálisis flácida, hipotermia y coma.

- Séptimo día post inoculación, dos de los cinco cerdos restantes unicamente mostraban discreta hiperexcitabilidad.

Durante estos días los cerdos del grupo testigo no mostraron alteraciones en su comportamiento, ni signología clínica alguna.

### **Evaluación postmortem**

En la necropsia de los cerdos pertenecientes al grupo experimental, a partir del día tres postinoculación, en cavidad craneana, se observó hiperemia meníngea; mientras que en cavidad torácica se apreciaron áreas de consolidación en lóbulos apicales e intermedios de pulmón que afectaban desde 3 y hasta aproximadamente 12 por ciento del parénquima.

### **Evaluación serológica.**

Los sueros de los lechones tanto del grupo experimental como del grupo testigo, antes de la inoculación y previo al sacrificio, se procesaron con la prueba de inhibición de la hemoaglutinación (IH) estandarizada para la detección de anticuerpos contra el *Rubulavirus* porcino, obteniendo títulos de 1:4 en todos los casos. De acuerdo a Ramírez y colaboradores (1996), este título se considera negativo a la presencia de anticuerpos contra este virus.

### **Evaluación microscópica.**

#### **a) Tinción de hematoxilina- eosina**

La evaluación microscópica de los cortes histológicos de encéfalo de los treinta cerdos del grupo experimental, dio como resultado discretos cambios vasculares y meníngeos asociados a edema, así como diferentes grados de hiperemia.

En los casos correspondientes a los días 4, 5, 6 y 7 post inoculación, se apreciaron focos de gliosis, satelitosis y neuronofagia, así como la presencia de escasos cuerpos de inclusión intracitoplasmáticos, eosinofílicos; además de varios focos con cuerpos apoptóticos, sobre todo en corteza temporal y tálamo (Figuras 16 y 17). En alveolo del hipocampo se apreció degeneración neuronal, principalmente en los sectores 1 y 2.

En los núcleos celulares, era más evidente la presencia de focos de degeneración neuronal, acompañada por satelitosis moderada.

En los cortes de cerebelo, se apreciaron cambios vasculares moderados y en los casos correspondientes a los días 5, 6 y 7 p.i., se apreciaron focos de vasculitis y vasculosis, acompañados por focos de leucomielomalacia.

En los cortes histológicos de médula espinal cervical, se observaron escasos focos de degeneración Walleriana.

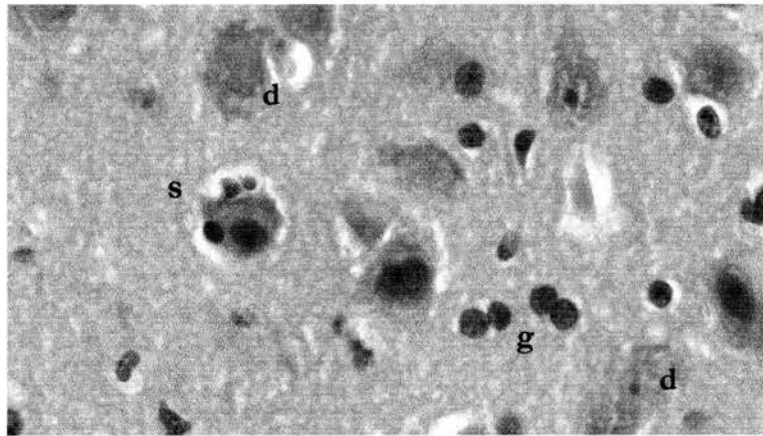


Figura 16. Sección histológica de corteza parietal, 4 días p.i., Tinción H-E, 200X.  
En la que se aprecia gliosis (G), degeneración neuronal (d) y satelitosis (s)

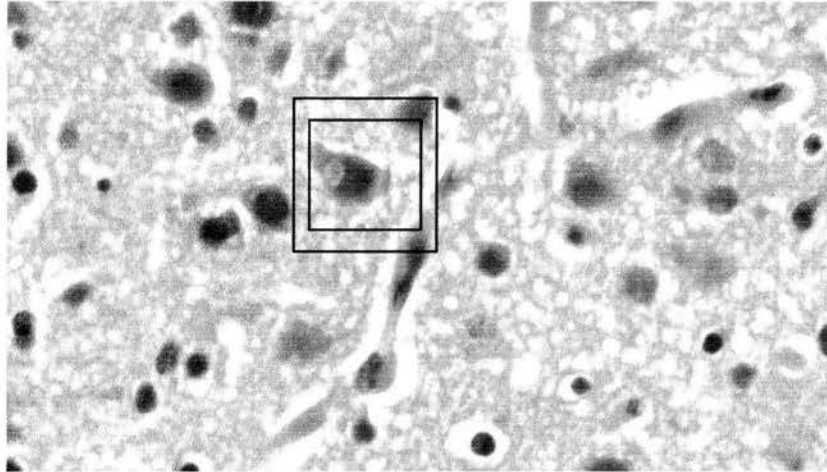


Figura 17. Sección histológica de corteza temporal, 5 días p.i., Tinción H-E, 200X.  
Cuerpo de inclusión intracitoplasmático (recuadro).

#### b) Tinción de metil verde pironina

Los cortes histológicos teñidos con ésta técnica, mostraron reacción positiva discreta, distribuida principalmente en células piramidales de neocorteza, putamen, células de Purkinje y astas ventrales de médula espinal (Figura 18).

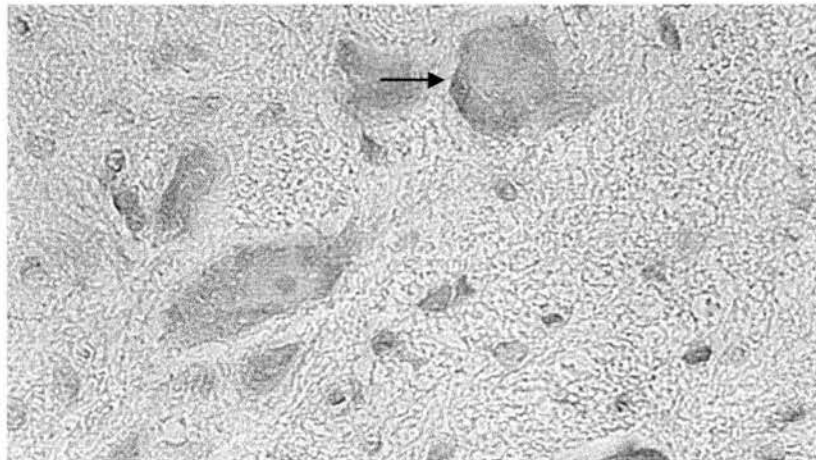


Figura 18. Sección histológica de corteza temporal, 5 días p.i., 200X.  
Tinción de Metil verde pironina con reacción positiva en citoplasma de varias neuronas.

Las alteraciones morfológicas antes mencionadas fueron discretas en la mayoría de los casos, por lo que se procedió a seleccionar un caso representativo de cada día post inoculación para su procesamiento con las técnicas inmunohistoquímicas.

### **c) Técnicas inmunohistoquímicas**

En el cuadro 1, se muestra el grado de inmunopositividad y su distribución con base en la citoarquitectura cerebral, de seis casos procesados con la técnica de streptavidina-biotina-peroxidasa; y en el cuadro 2, con la técnica de inmunofluorescencia indirecta auramina-rhodamina.

Como se puede observar al comparar ambas técnicas inmunohistoquímicas, en el cuadro 1 se aprecia reacción positiva en más láminas celulares que en los cortes procesados con la técnica de inmunofluorescencia indirecta, cuadro 2.

- **Lóbulo olfatorio:** En el cuadro 1, se observa que desde el día 1 p.i., es posible identificar positividad en la capa piramidal externa, de ésta estructura; y hacia el día 4 p.i. se incrementa el grado y número de capas celulares positivas, mostrando su máxima expresión hacia el día 7 p.i.
- **Lóbulos frontal y parietal:** Estas secciones mostraron mayor reacción positiva, principalmente en neocorteza, involucrando a las células piramidales internas y externas (Figura 19); así como núcleos celulares como putamen, globo pálido, y los núcleos rojo, pontino, olivar y ambiguo. En los cortes de los casos 3, 4, 5, 6 y 7 p.i., se apreció reacción positiva en endimocitos y en leptomeninge.
- **Alveolo del hipocampo,** en los casos que se describió degeneración neuronal en los sectores 1 y 2 con la tinción de H-E, se observó inmunopositividad en grados 2 y 3, a partir del día 3 p.i., con la técnica de streptavidina-biotina-peroxidasa.

- Los endoteliales de la parte olfatoria de ventrículo lateral y ventrículos laterales, son positivos a partir del día 4 p.i., mientras que con la técnica de inmunofluorescencia indirecta, éstos últimos fueron positivos desde el día 1 p.i. Los endoteliales del tercer ventrículo son positivos desde el día 3 p.i. con la técnica de streptavidina-biotina-peroxidasa con la técnica de IF, se observa positividad los días 1 y 4 p.i. Finalmente, los endoteliales del cuarto ventrículo, con la técnica de streptavidina-biotina-peroxidasa se aprecia positividad desde el día 4 p.i., con IF se observa a partir del día 3 y se observa hasta el día 7 p.i..
- Los núcleos celulares de Tálamo fueron positivos desde el día 3 p.i. con la técnica de streptavidina-biotina-peroxidasa.
- Cerebelo mostró más estructuras positivas con la técnica de streptavidina-biotina-peroxidasa que con la técnica de IF.
- Los núcleos celulares de puente fueron positivos desde el día 3 p.i. con la técnica de streptavidina-biotina-peroxidasa.
- Los núcleos celulares de médula oblonga fueron positivos desde el día 1 p.i. con la técnica de streptavidina-biotina-peroxidasa.
- En médula espinal, con la técnica de streptavidina-biotina-peroxidasa se observó mayor grado de positividad en astas ventrales que en dorsales. Con la técnica de inmunofluorescencia sólo se apreció reacción positiva en las astas ventrales.

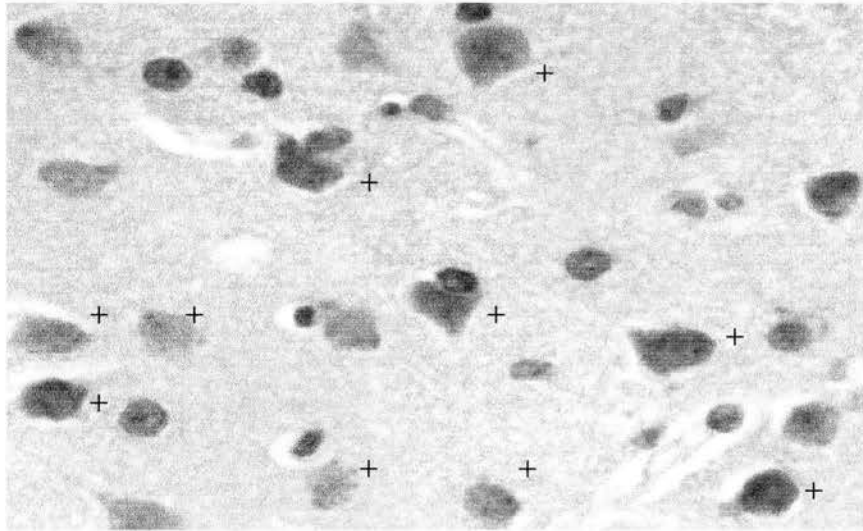


Figura 19. Sección histológica de corteza temporal, 3 días p.i., 200X.  
Tinción de streptavidina-biotina peroxidasa, con reacción positiva en citoplasma de células piramidales externas (+).

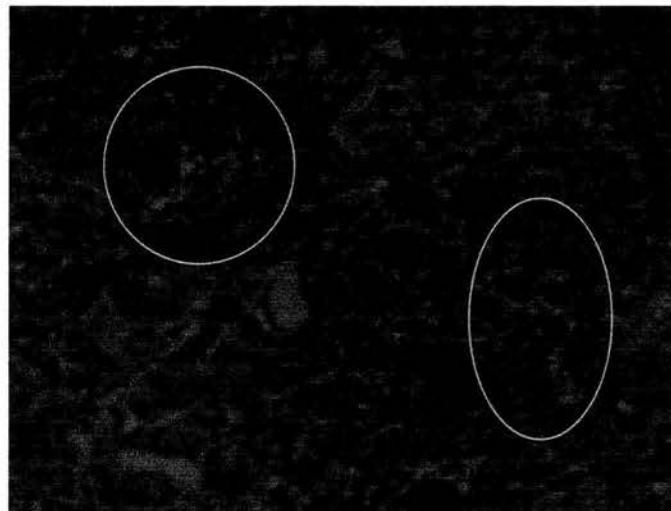


Figura 20. Sección histológica de Tálamo, núcleo caudado, 6 días p.i., 400X.  
Tinción de auramina-rhodamina (inmunofluorescencia indirecta), con reacción positiva en citoplasma (células dentro de la elipse).

La evaluación estadística de los resultados obtenidos con ambas técnicas inmunohistoquímicas, dio como resultado diferencia estadística entre ambas (P0000)(Cuadro3).

## Capítulo 4

### 4. DISCUSIÓN

La signología clínica observada en los cerdos de éste estudio, fue básicamente nerviosa, como describe Stephano, 1999.

En fases tempranas de la EOA, Stephano y cols. refieren pelo hirsuto, fiebre y sifosis, seguida por ataxia, debilidad, tremor muscular, rigidez de miembros torácicos y posición de sentado. Los signos clínicos observados en los animales de éste estudio se caracterizaron por alteraciones en el comportamiento y desordenes de personalidad, semejantes a lo descrito por Chrisman, en perros con enfermedad de distemper. En distemper canino, Chrisman menciona que los signos varían de acuerdo al sitio neuroanatómico involucrado y refiere cambios de comportamiento, tales como agresividad, irritabilidad y pasividad cuando la corteza temporal, el sistema límbico e hipotálamo están implicados (Chrisman, 1991). En éste estudio, se observaron alteraciones morfológicas e inmunorreacción en éstas estructuras, a partir del día 3 p.i., con la técnica de streptavidina-biotina peroxidasa y del día 4 p.i. con la técnica de auramina-rhodamina.

Otros signos clínicos que manifestaron los animales, en la fase temprana de éste estudio, fueron edema palpebral e hiperemia conjuntival. Estos signos se relacionan con la inoculación del virus de EOA por vía intranasal. Voet and Voet, refieren que los virus que ingresan por ésta vía, infectan y destruyen focos de células epiteliales en mucosa, con la consecuente reacción inflamatoria. Es posible que la infección e inflamación en mucosa nasal, se continúe a través de conducto nasolagrimal hacia conjuntiva y de ésta manera, desarrolle los signos observados en éstos casos.

En éste estudio, se observó reacción positiva con las técnicas inmunohistoquímicas en diferentes estructuras neuroanatómicas, tales como corteza cerebral, bulbo



olfatorio, lóbulo piriforme, cerebro medio, puente, médula oblonga, hipocampo, células de Purkinje y ependimocitos. Este hallazgo se relaciona con la expresión de receptores NeuAca $\alpha$ 2,3 y 2-6 galactosa para el virus de EOA en la mayoría de las estructuras antes mencionadas (Reyes Leyva y cols., 1993).

En la evaluación histopatológica de los casos con parálisis flácida, se apreció degeneración neuronal, acompañada por discretos focos de satelitosis, neuronofagia en corteza parietal, temporal y tálamo. Estas estructuras se relacionan con la propiocepción conciente de miembros torácicos y pelvianos.

La parálisis flácida observada en éstos casos, también se puede relacionar con los hallazgos microscópicos observados en médula espinal y la reacción positiva con la técnica de streptavidina-biotina-peroxidasa en astas ventrales de médula espinal, a partir del día 4 p.i.; mismos que se asocian al síndrome de neurona motora inferior. Este síndrome se caracteriza por la manifestación de parálisis flácida con hipo o arreflexia osteotendinosa, atrofia y reacción de degeneración (López-Antunez, 1990; Afifi y Bergman, 2001; Koutinas *et al.*, 2002).

En estadios posteriores de la enfermedad, Stephano, 1999, describe signos como letargia, movimientos involuntarios, midriasis, nistagmus, y temores. En éste estudio, a partir del cuarto día p.i., se observaron casos con desplazamiento en círculos, incoordinación, postración, corea y coma. Estos signos también se mencionan en casos de distemper canino. Chrisman asocia el deambular compulsivo o en círculos, con lesiones en la corteza de lóbulo frontal, cápsula interna y núcleo caudado. Otros signos en los que coinciden la EOA y distemper canino son somnolencia, semicoma y coma, en los que Chrisman refiere lesiones en lóbulo frontal, tálamo, subtálamo y cerebro medio (Chrisman, 1991). Lo anterior se confirma con los hallazgos histológicos y la inmunopositividad observada en éstas estructuras y en cerebelo, a partir del tercer día p.i. .

En humanos se refieren casos hipoactivos, somnolientos, con disminución masiva de la conducta espontanea, denominado síndrome *atimórmico*, relacionado a la ablación bilateral de globo pálido (Afifi y Bergman, 2001). Aunque éstos son signos producidos a partir de un proceso quirúrgico, describen la signología desarrollada tanto por animales con EOA, como con distemper canino.

En pacientes humanos jóvenes con infección por virus de la papera, Kumar *et al.*, refieren fiebre en 96.6% de los casos, convulsiones en el 70% y coma en 90% (Kumar *et al.*, 1989). Comparativamente, en la EOA, que está asociada a otro rubulavirus, se observaron animales con movimientos coreicos y coma hacia los días cuatro y cinco p.i.. Esta signología puede relacionarse con los hallazgos realizados en el núcleo caudado y el sector CA<sub>1</sub> de hipocampo, que también recibe el nombre de sector vulnerable, pues particularmente las neuronas piramidales, son muy sensibles a la anoxia e isquemia (Afifi y Bergman., 2001).

La hiperexitabilidad descrita en dos de los cerdos el día siete postinoculación, corresponde a manifestaciones clínicas tardías; a nivel histológico se observó hiperemia, cambios vasculares asociados a edema, gliosis y degeneración neuronal de corteza temporal (Afifi y Bergman, 2001).

De acuerdo con lo descrito por Stephano y Gay (Stephano y Gay, 1986), en éste estudio los cerdos agonizaban aproximadamente 48 horas después de iniciar la manifestación de signología clínica, esto ocurrió entre los días cinco y siete p.i.; esos cerdos fueron sacrificados por razones humanitarias.

En el examen macroscópico, se apreció hiperemia meníngea en los animales del grupo experimental, sacrificados a partir del tercer día postinoculación, hecho que coincide con la congestión observada en los cortes histológicos de esos casos.

En los cerdos que mostraban opacidad corneal unilateral, se apreció disminución de la visión en el ojo afectado, como describe Stephano, 1999.

En los cortes histológicos teñidos con hematoxilina-eosina, los hallazgos microscópicos fueron discretos, sin embargo, a partir del día cuatro p.i., se notaron focos de apoptosis en corteza temporal y tálamo. En distemper canino Moro y colaboradores (2003), describen la presencia de cuerpos apoptóticos en la capa granular de sustancia gris de cerebelo, por lo que suponen que la apoptosis juega un papel importante en la patogenia de ésta enfermedad. En el caso de la papera humana, también se ha observado apoptosis en diferentes regiones de cerebro de ratones transgénicos, inoculados con este paramyxovirus, que semejan la infección en individuos inmunocomprometidos (Evlashv, 2000). En casos humanos, McQuaid, *et al.* (1997), describen apoptosis de neuronas, oligodendrocitos, linfocitos y microglia de tres casos subagudos de papera humana.

Esta es la primera vez que se refiere la presencia de cuerpos apoptóticos en encéfalo asociados a infección con *Rubulavirus* porcino. Este hallazgo coincide con las descripciones de otras enfermedades asociadas a virus del mismo género. Takikita en 2001, plantea la participación de infecciones virales en la inducción del proceso de apoptosis neuronal, sugiriendo que la muerte celular en estadios tempranos de infección puede limitar la infección en el hospedero. Este mecanismo ha sido estudiado en casos de HIV, rabia, Sindbis virus y Reovirus, entre otros (Takikita *et al.*, 2001).

La gliosis descrita en estos casos involucra principalmente a astrocitos. En la enfermedad de Borna, Carbone *et al.*, 1989 refiere inmunopositividad de astrocitos y células de Schwann; sugiriendo su participación en el proceso de replicación viral.

Otro hallazgo histológico relevante es la presencia de focos de desmielinización y leucoencéfalomalasia observado en los casos 6 y 7 días p.i.. Esta alteración morfológica también se describe en casos de niños con infección por virus de papera humana, en canideos, por distemper canino y en aves por virus de la enfermedad de Marek (Fazakerley *et al.*, 2003, Konovalov *et al.*, 1981).

Los cortes histológicos teñidos con la técnica de Metil verde pironina, mostraron reacción positiva discreta, distribuida principalmente en células piramidales de neocorteza, putamen, células de Purkinje y astas ventrales de médula espinal. Estos hallazgos coinciden con la reacción positiva obtenida en las preparaciones teñidas con las técnicas inmunohistoquímicas. Sin embargo, con ésta técnica histoquímica pone de manifiesto los cuerpos de Nissl, hecho que puede generar confusión en la interpretación de resultados.

El resultado de la prueba de inhibición de la hemoaglutinación, en suero sanguíneo de todos los cerdos, fue negativo a la presencia de anticuerpos contra el *Rubulavirus* porcino. Lo anterior confirma que el hato del que provenían los cerdos, era negativo a ésta enfermedad.

La comparación de los resultados obtenidos con ambas técnicas inmunohistoquímicas, dio como resultado mayor sensibilidad y definición en la distribución de la reacción positiva, al emplear la técnica de streptavidina-biotina peroxidasa. Con ésta técnica, fue posible identificar estratos celulares positivos desde el primer día post inoculación.

En las preparaciones elaboradas con la técnica de inmunofluorescencia indirecta, se apreció reacción positiva en uniones intercelulares, éste hallazgo puede estar asociado al proceso de infección intercelular. Allan *et al*, refieren reacción positiva en cerebro medio hacia los días cinco, siete y ocho p.i. al emplear la técnica de inmunofluorescencia en cortes congelados de encéfalos de cerdos inoculados con el virus de EOA, a los tres días de edad. En el presente estudio, al utilizar la técnica de IF, se apreció inmunopositividad, principalmente en la capa piramidal externa a partir del tercer día p.i., así como en cuerpo geniculado y putamen en los días tres y cuatro p.i., respectivamente.

## Capítulo 5

### 5. CONCLUSIONES

- Con base en este estudio, se infiere que cerdos de dos días de edad son susceptibles a la infección por el *Rubulavirus* porcino, y que éste tiene un periodo de latencia que va de tres a seis días, a partir de los cuales se desarrolla signología clínica nerviosa caracterizada por incoordinación, postración y movimientos de carrera debido a la replicación viral en estructuras de la vía corticoespinal y los cambios degenerativos producidos tanto en corteza cerebral, tálamo, puente, médula oblongada y médula espinal.
- Los cambios morfológicos en somas neuronales fueron aparentes a partir del tercer día postinoculación, mismos que fueron corroborados con las técnicas inmunohistoquímicas.
- Los hallazgos histopatológicos fueron más abundantes a medida que aumentaban los días y la signología clínica era más evidente.
- El discreto grado de las lesiones histológicas, en presencia de signos clínicos evidentes, puede asociarse con un elevado grado de patogenicidad de la cepa viral usada para la elaboración del inóculo.
- En los diferentes cortes histológicos procesados con las técnicas de inmunohistoquímica e inmunofluorescencia, se aprecia reacción positiva en estructuras que forman parte de la vía corticoespinal y con el síndrome de neurona motora inferior.
- La técnica de streptavidina-biotina peroxidasa resultó más sensible que la técnica de inmunofluorescencia indirecta.
- La técnica de streptavidina-biotina peroxidasa permitió identificar estratos celulares positivos desde el primer día post inoculación.

- Las preparaciones elaboradas con la técnica de streptavidina-biotina peroxidasa permitieron identificar con más detalle las láminas celulares positivas a la reacción antígeno-anticuerpo, en comparación con las preparaciones elaboradas con la técnica de inmunofluorescencia indirecta. Sin embargo, ésta última, permitió apreciar reacción positiva en uniones intercelulares, hallazgo que puede estar asociado al proceso de infección intercelular.
- Esta es la primera vez que se refiere la presencia de cuerpos apoptóticos, en encéfalo, asociados a infección con *Rubulavirus* porcino. Este hallazgo coincide con las descripciones de otras enfermedades asociadas a virus del mismo género.
- Aunque los hallazgos encontrados en éste experimento muestran interesantes avances en cómo se desarrollan las lesiones a nivel histológico y como se distribuye el virus en encéfalo, es necesario perfeccionar esta metodología implementando las técnicas inmunohistoquímicas con el uso de un anticuerpo monoclonal, para mejorar la especificidad de la prueba.

## LITERATURA CITADA

1. **Stephano** HA y Gay GM. Encefalitis, trastornos reproductivos y opacidad de la córnea en cerdos (síndrome del Ojo Azul) asociados a un Paramyxovirus. Estudio cronológico. Med Vet 1986; 3: 359-362.
2. **Stephano** HA, Gay GM and Ramirez TC. Encephalomyelitis, reproductive failure and corneal opacity (blue eye) in pigs, associated with a Paramyxovirus infection. Vet Rec 1988; 122: 6-10.
3. **Stephano** HA. "Blue eye disease". Diseases of Swine. 7th edition. Editors, Leman AD, Straw BE, Mengeling WL, D'Allaire S and Taylor DJ. USA: Iowa State University Press, 1993.
4. **Reyes** LJ, Hernandez JP, Montaña LF and Zenteno E. The porcine Paramyxovirus LPM specifically recognizes sialyl ( $\alpha$  2,3) lactosa-containing structures. Arch Virol 1993; 133: 195-200.
5. **Fuentes** RMJ, Carreón NR, Ramírez MH, Trujillo OME, Fraire I. Estudio piloto de la frecuencia de anticuerpos contra el Paramyxovirus del Ojo Azul en cerdos en la República Mexicana. Rev Vet Méx 1992, 23: 37-39.
6. **Stephano** HA, Gay GM. El síndrome del Ojo Azul en cerdos de granjas engordadoras. Memorias de la Reunión de Investigación Pecuaria en México. México: SARH, UNAM, 1985.
7. **Stephano** HA. "Blue eye disease". Diseases of Swine. 8th edition. Editors Straw, BE, Mengeling WL, D'Allaire S and Taylor DJ. USA: Iowa State University Press, 1999.
8. **Rosales** EF, Martínez LA, Correa GP. Análisis retrospectivo(1972-1986) de la presencia de anticuerpos inhibidores de la hemaglutinación contra el Paramyxovirus porcino LPM, al parecer asociado con el "Síndrome del Ojo Azul". Tec Pec Mex 26, 304.

9. **Stephano A**, Doportto DJM y Gay GM. Estudio epidemiológico en dos granjas porcinas afectadas por el síndrome de Ojo Azul. Memorias de la Reunión de Investigación Pecuaria en México. México: SARH, UNAM, 1985.
10. **Visuet AO**, Martinez GR, Carreon NR, Lopez MJ, Pardal-Roa P, Mendoza GR, Hernández ML.: Experimental inoculation in mexican hairless boars with the Paramyxovirus of the blue eye disease. Proc Int Congr Pig vet Soc (1996) 14:127.
11. **Espinosa HS**. Evaluación de semen de cerdos inoculados con el virus del Ojo Azul. (tesis de Maestría en Ciencias de la producción y Salud Animal). Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM, 2001.
12. **Anónimo**. Proceedings of the First International Symposium upon Pig Paramyxovirus. Puebla, México: IMSS, 1994.
13. **Rima B**, Alexander DJ, Billeter NA, Collins PL, Kingsbury DW, Lipkind MA, Nagay Y, Örmell C, Pringle CR and Ter Meulen V. "Family Paramixoviridae" in Virus Taxonomy Classification and Nomenclature of Viruses. Edited by Murphy FA, Fanquet CM, Bishop DHL et al. Viena and New York: Springer-Verlag. 268,1995.
14. **Murphy FA**. "Virus Taxonomy" In Fields Virology (Fields BN, Knipe DM, Howley PM, Chanock RM, Melnick JL, Monath TP, Roizman B, Staus SE): Virlogy 3rd edition, Volume 1. USA: Lippincott Raven Publishers, 1996.
15. **Lamb RA** and Kolakofsky D. "Paramyxoviridae: The viruses and their replication" In Fields Virology (Fields BN, Knipe DM, Howley, Griffin ED, Martin AM, Lamb AR, PM, Roizman, B., Staus, S. E.): Virology. Fourth edition, Volume 1. USA: Lippincott Williams & Wilkins, 2001.
16. **ICTV**: Porcine rubulavirus. NCBI taxonomy database 2002 [[Genbank](#)]
17. **Murphy AF**, Gibbs EPJ, Horzinek CM and Studdert JM. Veterinary Virology. 3rd edition. USA: Academic Press, 1999.



18. **Sundqvist A**, Berg M, Hernandez-Jaureguí P, Linné T and Moreno-Lopez J. The structural proteins of a porcine Paramyxovirus. *Journal of General Virology* 1990; 71: 609-613.
19. **Voet D** and Voet GJ. *Biochemistry*. 2nd edition. USA: John Wiley and Sons, 1995.
20. **Vallejo V**, Reyes-Leyva J, Hernandez J, Ramirez H, Delannoy P and Zenteno E. Differential expression of sialic acid on porcine organs during the maturation process. *Comp Biochem Physiol* 2000; B 126: 415-424
21. **Charles MD**, Scheid A and Choppin WP. Importance of antibodies to the fusion glycoprotein of Paramyxoviruses in the prevention of spread of infection. *J Exp Med* 1980; 151: 275-288.
22. **Kingsbury W D**. *Paramyxoviridae and their replication*. Virology, 2nd edition. Raven Press, Ltd. 1990.
23. **Berg M**, Sundqvist A, Moreno-Lopez J and Linné T. Identification of the porcine Paramyxovirus LPMV matrix protein gene: comparative sequence analysis with other Paramyxoviruses. *Journal of General Virology* 1991; 72: 1045-1050.
24. **Sundqvist A**, Berg M, Moreno-Lopez J and Linné T. The haemagglutinin-neuraminidase glycoprotein of the porcine Paramyxovirus LPMV: comparison revealed the closest relationship to Simian virus 5 and mumps virus. *Arch Virology* 1992; 122: 331-340.
25. **Nordin NM** and Ong BL. The nipah virus outbreak and the effect on the pig industry in Malaysia. 16 IPVS Congress, Australia, 2000. 548-550
26. **Chua KB**, Bellini WJ, Rota PA, Harcourt BH, Tamin A, Lam SK, Ksiazek TG, Rollin PE, Zaki SR, Shieh WJ, Goldsmith CS, Gubler DJ, Roehring JT, Eaton B, Gould AR, Olson J, Field H, Daniels P, Ling AE, Peters CJ, Anderson LJ and Mahy BWJ. Nipah virus: a recently emergent deadly Paramyxovirus. *Science* 2000; 228: 1432-1435.

27. **Linné T**, Berg M, Bergvall AC, Hjertner B and Moreno-Lopez J. The molecular biology of the porcine Paramyxovirus LPMV. *Vet Microb*, 1992; 33: 263-273.
28. **Lamb RA** and Kolakofsky D. "Paramyxoviridae: The viruses and their replication. In *Fields Virology* (Fields BN, Knipe DM, Howley PM, Chanock RM, Melnick JL, Monath TP, Roizman B, Staus SE): Virology. 3rd edition, Volume 1. USA: Raven Publishers, 1996.
29. **Moreno-López J**, Correa-Girón P, Martínez A and Ericsson A. Characterization of a Paramyxovirus isolated from brain of a piglet in México *Arch Virology*, 1986; 91: 221-231.
30. **Cuetero RS**, Ramírez MH, Carreón NR, Campuzano GJ. Inoculación experimental del Paramyxovirus del Ojo Azul en ratas de laboratorio (cepa Wistar), vía intramuscular. *Vet Mex*, 1995; 26:3.
31. **Toschi A**. Enciclopedia monográfica de ciencias naturales. Primera edición, tomo 5. España: Editorial Aguilar, 1971.
32. **Lehninger LA**, Nelson LD and Cox MM. *Principles of Biochemistry*. 2nd edition. USA: Worth Publishers, 1993.
33. **Schultze B**, Zimmer G, Releer G. Virus entry into a polarized epithelial cell line (MDCK). Similarities and dissimilarities between influenza C virus and bovine coronavirus. *J Gen Virol* 1996; 77: 2507.
34. **Pérez PF**, Stephano HA y Gay GM. Estudio histológico en lechones inoculados experimentalmente con el Paramyxovirus de Ojo Azul. México: Memorias del XXIII Congreso Anual AMVEC, Guanajuato, Gto. 1988; 81-83.
35. **Hernández J**, Ramírez H, Carreón R, Mercado C, Hernández-Jáuregui P, Reyes-Leyva J y Zenteno E. Diferencias biológicas y estructurales definen dos grupos de Paramyxovirus porcino. Memorias XXIX Congreso Nacional AMVEC, Puerto Vallarta, Jalisco. México, 1994.

36. **Allan GM, McNeilly F, Walker I, Linne T, Moreno-Lopez J, Hernandez P, Kennedy S, Carroll BP, Herron B, Foster JC, Adair B.** A sequential study of experimental porcine paramyxovirus (LPMV) infection of pigs immunostaining of cryostat sections and virus isolation. *J Vet Diagn Invest* 1996; 8: 405-413.
37. **Afifi A K, Bergman RA.** Neuroanatomía funcional, texto y atlas. México: McGraw-Hill Interamericana, 2001.
38. **Carpenter BM.** Neuroanatomía fundamentos. Cuarta edición. Argentina: Editorial Panamericana, 1994.
39. **Geneser F.** Histología. Tercera edición. España: Editorial Médica Panamericana, 2000
40. **Chrisman LC.** Problems i smal animal neurology. Second edition. USA: Lea & Febiger, 1991.
41. **McNeilly F, Walker I, Allan GM, Foster JC, Linne T, Merza M, Hernandez P, Kennedy S, Adair B.** A comparative study on the use of virus and antibody detection techniques for the diagnosis of La Piedad Michoacan paramyxovirus (LPMV) infection in pigs. *J Vet Diagn Invest* 1997; 9: 3-9.
42. **Morilla GA, Diosdado VF, Gonzalez VD, Ojeda ZP, Mercado PM, Campomanes CA, Hernandez JP, Moreno L J.** Estudio comparativo entre la prueba de inmunoperoxidasa, ELISA e inhibición de la hemaglutinación para el diagnóstico serologico de la enfermedad de ojo azul en cerdos. *Symp Int Enf Em del cerdo.* Irapuato, Guanajuato, México. 2000.
43. **Coons A H and Kaplan M H.** Localization of antigen in tissue cells. II Improvements in a method of antigen by means of fluorescent antibody. *J Exp Med* 1950; 91: (1),13.
44. **Benites B L.** Apuntes sobre inmunohistoquímica. México: IMSS, 1982.

45. **Tijssen P.** Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology, Practice and theory of enzyme immunoassays. First edition, Vol 15. The Netherlands: Elsevier, 1985.
46. **Difco.** Fluorescent antibody reagents and procedures for rapid, precise, sensitive F.A. techniques. Detroit, Mich. USA: DIFCO Laboratories, 1965.
47. **Riggs JL, Seiwalds RJ, Burckhalter JH, Downs CM and Metcalf TG.** Isothiocyanate compounds as fluorescent labeling agents for immune serum. Am J Path 1958; 34: 1081- 1097.
48. **Catty D.** Antibodies: Volume II. 2nd edition. England: Oxford University Press, 1990.
49. **Edwards S, Chasey D and White H.** Experimental infectious bovine rhinotracheitis: comparison of four antigen detection methods. Res Vet Sci 1983; 34: 42-45.
50. **Reynolds KC and Nelson AJ.** Techniques for double-labeling virus infected cells. Animal virus pathogenesis. USA: Oxford University Press, 1990.
51. **Sternberg L A, Hardy HP, Cuculis JJ and Meyer GH.** The unlabeled antibody enzyme method of immunochemistry. Preparation and properties of soluble antigen-antibody complex (horseradish peroxidase) and its use in identification of spirochetes. J of Histochem and Cytochem 1970; 18: 315-333.
52. **Roszkowsky J, Bartoszcze M and Zadura J.** Use of immunoenzyme technique for the detection of Aujeszky's disease virus in cell culture. Vet Rec 1978; 102: 462-463.
53. **Gay J M.** Pruebas de laboratorio para el diagnóstico de Ojo Azul. Pruebas de laboratorio para el diagnóstico de Ojo Azul. Memorias Curso sobre actualización de las enfermedades virales del cerdo. México: UNAM, 1986.
54. **Roy T C.** Immunomicroscopy: A diagnostic tool for the surgical pathologist. USA: W. B. Saunders, Co. 1986.

55. **Haines M D** and **Chelack J B**. Technical considerations for developing enzyme immunohistochemical staining procedures on formalin-fixed paraffin-embedded tissues for diagnostic pathology. *J Vet Diagn Invest* 1991; 3: 101-112.
56. **McMackie R**, **Young H**. Use of the immunofluorescence technique in diagnostic dermatopathology. *Association of clinical Pathologists: Broadsheet* 110, april 1984.
57. **Allan GM**, **McNulty MS**, **Todd D** and **Mc Ferran JB**. The rapid detection of Aujeszky's disease virus in pigs by direct immunoperoxidase labelling. *Vet Microbiol* 1985; 10: 481-486.
58. **Ramirez-Herrera M L**, **Mendoza-Magaña** and **Dueñas S**. Experimental infection of swine and cat central nervous systems by the pig Paramyxovirus of the blue eye disease. *J Vet Med* 1997; 44:461-476.
59. **Meador PV**, **Tabatabai LB**, **Hagemoser WA** and **Dyoe BL**. Identification of *Brucella abortus* in formalin-fixed, parafin embedded tissues of cows, goats and mice with an avidin-biotin-peroxidase complex immunoenzymatic staining technique. *Am J Vet Res* 1986; 47:2147-2150.
60. **Bourgon A R** and **Charlton KM**. The demonstration of rabies antigen in paraffin-embedded tissues using the Peroxidase-Antiperoxidase method: a comparative study. *Can J Vet Res* 1987; 51: 117-120.
61. **Narita M**, **Imada T**, **Takada M**, **Ishbashi K**, **Nemoto F**, **Haritani M** and **Kobayashi M**. Detection of reactivating pseudorabies virus in tissue by immunoperoxidase technique. *J Comp Path* 1989; 101: 151-158.
62. **Boone C W** and **Kelloff G J**. Development of surrogate and point biomarkers for clinical trials of cancer chemopreventive agents: relationships to fundamental properties of preinvasive (intraepithelial) neoplasia. *J Cell Biochem (suppl.)* 19:10-22.
63. **Cartun W R**. Immunohistochemistry of infectious diseases. *J Histotechnol*, 1995, 18 (3): 195-202.

64. **Johnson** CW. Issues in immunohistochemistry. *Toxicol Pathol*, 1999; Mar, 27:2, 246-248
65. **Naish** J S. Handbook of immunochemical staining methods. USA: Dakko Corporation, 1989.
66. **Chandler** W F and **Watts** CJ. Current Concepts in Pathologic diagnosis: Fungal diseases. *J of histotec* 1995, 18:3, 247-252.
67. **Leake** R, **Barnes** D, **Pinder** S, **Ellis** I, **Anderson** L, **Anderson** T, **Adamson** R, **Rhodes** T, **Miller** K and **Walker** R. Immunohistochemical detection of steroid receptors in breast cancer: a working protocol. *J Cli Pathol*, 2000; Aug, 53:8, 634-635
68. **Abbas** K A, **Lichtman** A H and **Pober** JS. Inmunología celular y molecular. España: McGraw-Hill Interamericana, 2002.
69. **Bancroft** D J, **Cook** C H, **Stirling** W R and **Turner** R D. Manual of histological techniques and their diagnostic application. Great Britain: Churchill Livingstone, 1994.
70. **Quezada** O, **Fernández** R y **Martín de las Mulas** J. Aplicación en Patología Veterinaria de las técnicas inmunohistoquímicas parte I y II. *Patología Animal* 1989; 3 (2):4-7.
71. **Quezada** O, **Fernández** R y **Martín de las Mulas** J. Aplicación en Patología Veterinaria de las técnicas inmunohistoquímicas parte II. *Patología Animal*. 1990; 4 (2): 5-8.
72. **Goldman** M. Fluorescent antibody methods. USA: Academic press, 1968.
73. **Sheehan** C D, **Hrapchak** B B. Theory and Practice of Histotechnology. Second edition. USA: The C.V. Mosby Company, 1980.
74. **Dubois Dalcq** M, **McFarland** H and **McFarlin** D. Protein A-peroxidase: a valuable tool for the localization of antigens. *J Histochem Cytochem*. 1977; 25 (11):1201-6.

75. **Mason** TE, Phifer R F, Spicer SS, Swallow RA and Dreskin RB. J Histochem Cytochem 1969; 17: 563.
76. **Taylor** CR. Immunomicroscopy: a diagnostic tool for the surgical pathologist. USA: W.B. Saunders Co., 1986.
77. **Ducatelle** R, Palmer D, Ossent P and Hoorens J. Inmunoperoxidase study of adenovirus pneumonia in dogs. Vet Quart 1985; 7 No.4: 290-296.
78. **Sigma** Catálogo, 2001.
79. **Anónimo**. Manual de técnicas de diagnóstico virológico. Red de cooperación técnica entre laboratorios de investigación y diagnóstico veterinario. Santiago, Chile: F.A.O., 1988.
80. **Puchtler** H and Meloan S N. On the chemistry of formaldehyde fixation and its effects on immunohistochemical reactions. Histochemistry 1985; 82: 201-204.
81. **Mason** JT and Oleary TJ. Effects of formaldehyde fixation on protein secondary structure: a calorimetric and infrared spectroscopic investigation. J Histochem Cytochem 1991; 39: 225-229.
82. **Battifora** H. Memorias XXXV Reunión Anual en Provincia, Puebla, Puebla. México: Asociación Mexicana de Patólogos, 1992.
83. **Shi** S, Key ME and Kalara K L. Antigen retrieval in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: an enhancement method for immunohistochemical staining based on microwave oven heating of tissue sections. J Histochem Cytochem 1991; 39: 741-748.
84. **Cattoretti** G, Pileri S, Prravicini C, Becker HGM, Poggi S, Bifulco C, Key G, D'Amato L, Sabattini E, Feudale E, Reynolds F, Gerdes J and Rilke F. Antigen unmasking on formalin-fixed. Paraffin-embedded tissue sections. J Pathol 1993; 171: 83-98.
85. **Norton** A J. Microwave oven heating for antigen unmasking in routinely processed tissue sections. J Pathol, 1993; 171: 79-80.

86. **Norton** AJ, Jordan S and Yeomans P. Brief, high-temperature heat denaturation (pressure cooking): a simple and effective method of antigen retrieval for routinely processed tissues. *J Pathol*, 1994; 173: 371-379.
87. **Tani** Y, Key ME and Spaulding D. Development of a Signal Amplification Method for *In situ* Hybridization: Comparison with PCR *In situ* Amplification. Washington D.C.: U.S. and Canadian Academy of Pathology, 1996.
88. **Bruce** G. Rittfalls of immunogold labeling: Analisis analysis by light microscopy transmission electron microscopy, and photoelectron microscopy. *J Histochem Cytochem* 1987; 35, No. 8: 843-853.
89. **Hayat** MA. Inmunogold-silver staining overview. *J Histochechnology*, 1993; 16, No. 3: 197-199.
90. **Burleson** FG, Chambers TM and Wiedbrauk DL. *Virology a laboratory manual*. USA: Academic Press, Inc, pp125-134, 1992.
91. **Ramírez** MH, Carreón NR, Mercado GC y Rodríguez TJ. Hemoaglutinación e inhibición de la hemoaglutinación del Paramyxovirus porcino a través de la modificación de algunas variables que participan en la prueba. *Vet Méx* 1996; 27 (3): 257-259.
92. **Wagstrom** E. Diagnostic performance of a reverse transcriptionpolymerase chain reaction test for porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J Vet Diagn Invest* 2000; 12:75-78.
93. **Harlow** E and Lane D. *Antibodies a Laboratory Manual*. USA: Cold Spring Harbor Laboratory, 1988.
94. **Gavilondo** CJV. *Anticuerpos monoclonales*. Cuba: Elfos Scientiae, pp25-27, 1995.
95. **Visuet** A O. Aislamiento del Paramyxovirus del Ojo Azul a los 5, 10, 20, 30 y 45 días post inoculación en cerdos de la raza pelón mexicano. (tesis de Licenciatura). Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM, 1995.



96. **Taylor D J.** Pig diseases. Seventh edition. Great Britain: St Edmundsbury Ltd.. pp11,12. 1999.
97. **Plumb CD.** Veterinary drug handbook. Third edition. USA: Iowa University Press, 1999. 305-306 pp.
98. **Aluja SA y Constantino CF.** Técnicas de necropsias en animales domésticos. Segunda edición, 10 pp. México: El Manual Moderno, 2002.
99. **Straw BE and Meuten DJ.** Physical examination. Diseases of swine. 7th edition. Editors Leman, A. D., Straw, B. E., Mengeling, W. L., D'Allaire, S. and Taylor, D. J. USA: Iowa State University Press, 1993.
100. **Naish JS.** Handbook of immunochemical staining methods. USA: Dako Corporation, 1989.
101. **Sandusky EG and Wightman AK.** Application of the peroxidase-antiperoxidase procedure to the localization of pituitary hormones and calcitonin in various domestic animals and human beings. Am J Vet Res 1985; 46: 739-741.
102. **Sanchez A, Lawzerwitsch VI.** Lecciones de embriología veterinaria. Tercera edición. Argentina: Editorial Hemisferio Sur. 1984.
103. **Hall J.** Inclusión de tejidos. En: Prophet E.B., Mills B, Arrington, J.B.Soin L.H. editores. Métodos histotecnológicos. Washington (DC): Instituto de Patología de las fuerzas armadas de los Estados Unidos de América, 1995: 41-46.
104. **Bancroft JD, Cook HC, Stiling RW.** Manual of histological techniques and their diagnostic application. Inland: Churchill Livingstone. 1994.
105. **García del MR.** Laboratorio de anatomía patológica. Primera edición. España: McGraw-Hill-Interamericana de España, 1993.
106. **Scheuer PJ and Chalk BT.** Clinical Tests Histopathology. The Netherlands: Wolfe Medical Publications Ltd, 1986.
107. **Carlton WW and McGavin MD.** Thomson's veterinary special pathology. USA: Mosby, 1995.

- 108.Cifuentes** F, Gonzalez CE, Fiordeliso T, Guerrero G, Lai FA, Hernandez-Cruz A. A ryanodine fluorescent derivative reveals the presence of high-affinity ryanodine binding sites in the Golgi complex of rat sympathetic neurons, with possible functional roles in intracellular Ca (2+). *Cell Signal*. 2001; May, 13 (5):353-62.
- 109.Ruckerbusch** Y, Phaneuf LP and Dunlop R. *Fisiología de pequeñas y grandes especies*. México: El Manual Moderno, 1994.
- 110.Pradal** RP. Bacteria in post-antimicrobial enteritis in weaned pigs. 373pp. Ph.D. Thesis. Faculty of Veterinary Medicine University of Glasgow, Scotland, 1994.
- 111.Carlton** WW and McGavin MD. *Thomson's Special Veterinary Pathology*. 2<sup>nd</sup> ed. Mosby, - USA 1995.
- 112.Schobesberger** M, Zurbriggen A, Summerfield A, Vandervelde MGrC. Oligodendroglial degeneration in distemper: apoptosis or necrosis? *Acta Neuropathol (Berl)*. 1999 Mar; 97(3):279-87.
- 113.Summers** BA, Appel MJ. Aspects of canine distemper virus and measles virus encephalomyelitis. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 1994 Dec;20 (6):525-34.
- 114.Moro** L, Martins AS, Alves CM, Santos FG, Del Puerto HL, Vascoceles AC. Apoptosis in the cerebellum of dogs with distemper. *J Vet Med Infect Dis Vet Public Health*. 2003 Jun;50 (5):221-5.
- 115.Evslashev** A, Moyse E, Valentin H, Azocar O, Trescol-Biemont MC, Marie JC, Roubourdin-Combe C., Horvat B. :Productive measles virus brain infection and apoptosis in CD transgenic mice. *J Virol*. 2000, Feb;74(3):1373-82.
- 116.McQuaid** S, McMahon J, Herron B, Cosby SL. Apoptosis in measles virus-infected human central nervous system tissues. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 1997 Jun;23 (3):218-24.
- 117.Takikita** S, Takano T, Narita T, Takikita M, Ohno M, Shimada M. Neuronal apoptosis mediated by IL-1 beta expresión in viral encephalitis caused by

neuroadapted strain of the mumps v. (Kilham Strain) in hamsters. *Exp Neurol* 2001 Nov; 172(1):47-59.

- 118. López-Antunez L.** Anatomía funcional del sistema nervioso. México: Editorial Limusa. 1990.
- 119. Konovalov GV, Dobykin AM.** Demyelinating processes of a viral nature. *Arkh Patol.* 1981; 43 (11):92-97.
- 120. Fazakerley JK, Walker R.** Virus demyelination. *J Neurovirol.* 2003 Apr; 9(2): 148-164.
- 121. Koutinas AF, Polizopoulou ZS, Baumgaertner W, Lekkas S, Kontos.** Relation of clinical signs to pathological changes in 19 cases of canine distemper encephalomyelitis. *J Comp Pathol.* 2002 Jan; 126(1): 47-56.
- 122. Kumar R, Kumar A, Dubey A, Misra PK.** Acute encephalopathy associated with measles. *Indian J Pediatr.* 1989 May-Jun; 56(3): 349-354.
- 123. Daniel WW.** Bioestadística. Base para el análisis de las Ciencias de la Salud. 3ª ed. México; Limusa 1991.



Cuadro 1. Citoarquitectura y resultados de la técnica de streptavidina-biotina-peroxidasa

	tracto olfatorio	0	0	0	0	0	0	0
	comisura anterior de la pars anterior	0	0	0	2	0	0	0
	cuerpo calloso	0	0	0	0	0	0	0
	ependimocitos	0	0	3	0	2	2	0
6	capa I (molecular)	0	1	0	1	1	1	0
	capa II (granular externa)	0	1	1	1	1	1	0
	capa III (piramidal externa)	0	3	2	1	1	1	0
	capa IV (granular interna)	2	1	3	1	2	2	0
	capa V (piramidal interna)	2	3	3	2	3	2	0
	capa VI (multiforme)	2	3	2	2	3	2	0
	núcleo de la comisura posterior	0	2	2	2	2	2	0
	alveolo del hipocampo	0	0	0	0	0		0
	C.A.1	0	2	2	2	2	3	0
	CA2	0	3	2	2	2	3	0
	CA3	0	1	2	0	0	0	0
	CA4	0	1	2	0	0	0	0
	lámina molecular	0	3	3	1	1	2	0
	lámina piriforme compacta	0	2	2	0	0	0	0
	Lámina rostral a la compacta	0	2	3	0	0	0	0
	cuerpo geniculado lateral	0	0	0	0	0	0	0
	cuerpo geniculado medial	0	0	2	0	0	0	0
	lóbulo piriforme	0	2	3	0	0	0	0
	ependimocitos del tercer ventriculo	0	3	3	3	3	2	0
	meninge	0	2	2	2	2	0	0
	Substancia negra	0	3	2	3	3	2	0
	núcleo rojo	0	3	2	2	3	2	0
7	capa I (molecular)	0	1	1	0	1	1	0
	capa II (granular externa)	0	2	2	0	1	2	0
	capa III (piramidal externa)	0	2	2	0	2	2	0
	capa IV (granular interna)	0	1	3	0	0	3	0
	capa V (piramidal interna) escasa	0	0	0	0	0	0	0
	capa VI (multiforme)	0	2	3	0	1	2	0
	ependimocitos del cuarto ventriculo	0	0	3	0	0	0	0
	meninge	0	0	0	0	0	0	0
8	células de la granulosa	0	2	0	0	2	1	0
	células de Purkinje	0	0	2	0	1	1	0
	glía en substancia blanca	0	0	2	0	2	1	0
	núcleo del tracto mesencefálico	0	2	2	0	3	2	0
	núcleo parapenduncular	0	2	3	0	2	3	0
	núcleo del lemnisco lateral ventral	0	2	1	0	0	0	0
	Núcleo pontino	0	3	3	0	2	3	0
	Núcleo motor del nervio trigémino	0	3	0	0	0	2	0
9	células de la granulosa	0	2	0	0	0	1	0
	células de Purkinje	0	1	0	0	0	1	0
	glía en substancia blanca	0	1	0	0	0	0	0
	núcleo del tracto mesencefálico del nervio tri	0	0	0	0	0	0	0

Cuadro 1. Citoarquitectura y resultados de la técnica de streptavidina-biotina-peroxidasa

	núcleo parapeduncular resección lateral del cu	0	0	0	0	0	0	0
	núcleo motor del nervio trigémino	0	0	0	0	0	0	0
	núcleo sensorial superior del nervio trigémino	0	0	0	0	0	0	0
	piramide	0	0	0	0	0	0	0
	núcleo del tracto espinal de nervio trigémino	0	0	2	0	0	0	0
	núcleo dorsal del cuerpo trapesoide	0	0	0	0	0	0	0
	núcleo cuneato accesorio	2	3	3	0	0	0	0
	núcleo vestibular inferior	1	2	2	0	0	0	0
	núcleo dorsal del nervio vago	1	2	3	0	0	1	0
	núcleo del nervio hipogloso	1	3	3	0	0	2	0
	núcleo del tracto espinal del nervio trigémino	1	2	0	0	0	0	0
	núcleo ambiguo	0	3	3	0	0	0	0
	núcleo olivar accesorio dorsal	0	0	2	2	2	2	0
	núcleo olivar	0	0	2	1	1	2	0
	núcleo olivar accesorio medial	0	0	2	0	0	0	0
10	Astas ventrales motoras (macroneuronas)	0	0	3	3	3	3	0
	Astas dorsales (microneuronas)	0	0	2	2	2	2	0
	Núcleo tracto espinal del nervio trigémino	0	0	0	0	0	0	0
	Nucleo gracilis	0	0	2	0	0	1	0
	axones	0	0	1	1	0	1	0

Cuadro 2. Citoarquitectura y resultados de la técnica de auramina-rhodamina (IF indirecta).

Id	Estructura	Día 1 p.i.	Día 3 p.i.	Día 4 p.i.	Día 5 p.i.	Día 6 p.i.	Día 7 p.i.	Testigo
1	capa I (molecular)	0	0	0	0	2	0	0
	capa II (granular externa)	0	0	0	0	0	0	0
	capa III (piramidal externa)	0	2	2	1	2	1	0
	capa IV (granular interna)	0	0	0	0	0	0	0
	capa V (piramidal interna)	0	1	0	0	0	0	0
	capa VI (multiforme)	1	0	2	1	0	0	0
	ependimocitos	0	0	0	0	0	0	0
2	capa I (molecular)	0	0	0	0	0	0	0
	capa II (granular externa)	0	0	0	0	0	2	0
	capa III (piramidal externa)	0	2	0	1	1	0	0
	capa IV (granular interna)	0	0	0	0	1	1	0
	capa V (piramidal interna)	0	1	0	1	0	0	0
	capa VI (multiforme)	0	0	0	0	0	0	0
	substancia blanca	0	0	0	0	0	0	0
3	capa I (molecular)	0	0	0	0	0	0	0
	capa II (granular externa)	0	0	0	0	1	0	0
	capa III (piramidal externa)	0	2	0	0	1	0	0
	capa IV (granular interna)	0	0	0	0	1	0	0
	capa V (piramidal interna)	0	1	1	2	0	1	0
	capa VI (multiforme)	0	0	0	0	0	0	0
	substancia blanca	0	0	0	0	0	0	0
	ventriculo lateral, parte olfatoria	0	0	0	1	0	0	0
	ependimocitos	0	0	0	0	0	0	0
	cuerpo geniculado	0	1	1	0	0	1	0
4	capa I (molecular)	0	0	0	0	0	0	0
	capa II (granular externa)	0	0	0	0	0	0	0
	capa III (piramidal externa)	1	1	1	0	0	0	0
	capa IV (granular interna)	0	0	0	0	0	0	0
	capa V (piramidal interna)	1	0	1	1	0	0	0
	capa VI (multiforme)	0	0	0	0	0	0	0
	nucleo caudado	0	0	0	2	0	0	0
	putamen	0	0	1	1	1	0	0
	comisura anterior de la pars anterior	0	0	0	0	0	0	0
	ependimocitos	0	0	1	1	0	0	0
	globo pálido	0	0	0	0	0	0	0
	cuerpo geniculado	0	0	0	0	0	0	0
5	capa I (molecular)	0	0	0	0	0	0	0
	capa II (granular externa)	0	0	0	0	0	0	0
	capa III (piramidal externa)	1	0	1	0	0	0	0
	capa IV (granular interna)	0	0	1	0	0	0	0
	capa V (piramidal interna)	0	0	1	0	0	0	0
	capa VI (multiforme)	0	0	0	0	0	0	0
	núcleo caudado	0	0	0	0	0	0	0
	putamen	0	0	1	1	1	2	0
	globo pálido	0	0	0	0	1	2	0
	tracto olfatorio	0	0	0	1	0	0	0
	comisura anterior de la pars anterior	0	0	0	0	0	2	0
	cuerpo caloso	0	0	1	0	2	0	0
	ependimocitos	2	0	2	0	0	2	0

Cuadro 2. Citoarquitectura y resultados de la técnica de auramina-rhodamina (IF indirecta).

6	capa I (molecular)	0	0	0	0	0	0	0
	capa II (granular externa)	0	0	0	0	0	0	0
	capa III (piramidal externa)	1	1	1	2	0	0	0
	capa IV (granular interna)	0	0	0	0	0	0	0
	capa V (piramidal interna)	0	0	0	1	0	0	0
	capa VI (multiforme)	0	0	0	0	0	0	0
	núcleo de la comisura posterior	0	0	0	0	0	0	0
	alveolo del hipocampo	0	0	0	2	0	0	0
	C.A.1	0	0	1	0	1	0	0
	C.A.2	0	0	1	0	0	1	0
	C.A.3	0	0	0	0	0	0	0
	C.A.4	0	0	0	0	0	0	0
	lámina molecular	0	0	0	0	0	0	0
	lámina piriforme compacta	0	0	0	0	0	0	0
	Lámina rostral a la compacta	0	0	0	0	0	0	0
	cuerpo geniculado lateral	0	0	0	0	0	0	0
	cuerpo geniculado medial	0	0	0	0	0	0	0
	lóbulo piriforme	0	0	0	2	0	0	0
	ependimocitos de tercer ventrículo	1	0	1	0	0	0	0
	meninge	0	0	0	1	1	1	0
	substancia negra	0	0	0	0	0	0	0
	núcleo rojo	0	0	0	0	0	0	0
7	capa I (molecular)	0	0	0	0	0	0	0
	capa II (granular externa)	0	0	0	0	0	0	0
	capa III (piramidal externa)	0	0	0	0	0	0	0
	capa IV (granular interna)	0	0	0	0	0	0	0
	capa V (piramidal interna)	0	1	0	0	0	0	0
	capa VI (multiforme)	0	0	0	0	0	0	0
	ependimocitos del 4° ventrículo	0	1	1	0	1	1	0
	meninge	0	0	0	0	0	0	0
8	células de la granulosa	0	0	0	0	0	0	0
	células de Purkinje	0	0	0	0	0	0	0
	glía en substancia blanca	0	0	0	0	0	0	0
	núcleo del tracto mesencefálico	0	0	0	0	0	0	0
	núcleo parapeduncular	0	0	0	0	0	0	0
	núcleo del lemnisco lateral ventral	0	0	0	0	0	0	0
	núcleo pontino	0	0	0	0	0	0	0
	núcleo motor del nervio trigémino	0	0	0	0	0	0	0
9	células de la granulosa	0	0	0	0	0	0	0
	células de Purkinje	0	2	0	0	0	2	0
	glía en substancia blanca	0	2	0	0	0	2	0
	núcleo del tracto mesencefálico del r	0	0	0	0	0	0	0
	núcleo parapeduncular resección later	0	0	0	0	0	0	0
	núcleo motor del nervio trigémino	0	0	0	0	0	0	0
	núcleo sensorial superior del nervio t	0	0	0	0	0	0	0
	piramide	0	0	0	0	0	0	0
	núcleo del tracto espinal de nervio trig	0	0	0	0	0	0	0
	núcleo dorsal del cuerpo trapesoide	0	0	0	0	0	0	0
	núcleo cuneato accesorio	0	0	0	0	0	0	0
	núcleo vestibular inferior	0	0	0	0	0	0	0



Cuadro 2. Citoarquitectura y resultados de la técnica de auramina-rhodamina (IF indirecta).

	núcleo dorsal del nervio vago	0	0	0	0	0	0	0
	núcleo del nervio hipogloso	0	0	0	0	0	0	0
	núcleo del tracto espinal del nervio tri	0	0	0	0	0	0	0
	núcleo ambiguo	0	0	0	0	0	0	0
	núcleo olivar accesorio dorsal	0	0	0	0	0	0	0
	núcleo olivar	0	0	0	0	0	0	0
	núcleo olivar accesorio medial	0	0	0	0	0	0	0
		0	0	0	0	0	0	0
10	Astas ventrales motoras (macroneur	0	0	0	0	1	1	0
	Astas dorsales (microneuronas)	0	0	0	0	0	0	0
	Núcleo tracto espinal del nervio trigém	0	0	0	0	0	0	0
	Núcleo gracilis	0	0	0	0	0	0	0
	Axones	1	1	0	0	0	0	0

Cuadro 3. Evaluación estadística de los resultados obtenidos con ambas técnicas inmunohistoquímicas. Prueba de  $\chi^2$

Técnica /grado de inmunopositividad	1	2	3
Técnica streptavidina-biotina-peroxidasa	87	153	88
Técnica de Inmunofluorescencia indirecta	63	22	0