



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

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

**“EVALUACIÓN DEL EFECTO TERAPÉUTICO DEL FACTOR DE
TRANSFERENCIA ESPECÍFICO (F_{T_e}) SOBRE PARÁMETROS
INMUNOLÓGICOS EN CACHORROS INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE
CON VIRUS DE MOQUILLO CANINO (VMC)”**

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

P R E S E N T A
ANA MARÍA HERNÁNDEZ VILLALOBOS

TUTOR: Andrés Romero Rojas
COMITÉ TUTORAL: Irma Eugenia Candanosa Aranda
Eduardo Pablo Correa Girón



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Este trabajo fue financiado parcialmente por los proyectos:

Proyecto de Factor de Transferencia, de la ENCB, IPN.

PACIVE Clave CONS-204, de la FES C, UNAM.

Alumna becaria CONACYT
Registro 204752

DEDICATORIAS

A mi familia:

Mariana y Juan Carlos, gracias por regalarme la oportunidad de compartir la vida con ustedes. Los quiero muchísimo.

A mis padres y hermanos

Josefina y Rafael, por ser un ejemplo a seguir y por ser el apoyo permanente de todos nosotros.

Alicia, Laura, Rafael, Araceli, Rebeca y Diana, gracias por su compañía y por estar juntos en los momentos importantes. Gracias por mis cuñados (y cuñada) y sobrinos también.

Los quiero a todos.

AGRADECIMIENTOS

A mis tutores y sinodales: Dr. Andrés Romero, Dra. Irma Eugenia Candanosa, Dr. Pablo Correa, Dra. Susana Mendoza, Dra. Laura Cobos, Dr. Juan Antonio Montaraz, Dr. Jesús Marín. Gracias por sus valiosa participación para la realización de este trabajo.

Al Dr. Sergio Estrada Parra y su equipo del Proyecto de Factor de Transferencia del IPN, por el financiamiento y la asesoría.

Al Dr. Ernesto Moreno, por el apoyo moral y financiero.

A las personas del laboratorio 8 de la Unidad de Posgrado e Investigación, MC Erik González, MC Omar Azaf Ruíz, MVZ Elizabeth Miranda; gracias a todos por sus consejos y experiencia.

A la Dra. Susana Mendoza y todo el personal del laboratorio de Virología y Bacteriología de la Unidad de Posgrado e Investigación, FES C, campo 1; por brindarme su espacio, su tiempo y sus conocimientos. Mil gracias!!

Al MC Victor Hugo Rosales, del laboratorio de Citometría en Laboratorios Centrales del Cinvestav-IPN Zacatenco, por el soporte técnico para realizar la citometría de flujo.

A la MVZ Yolanda Romero, del área de Patología, sección de Ciencias de la Salud Animal, de FES C; por su excelente trabajo en la elaboración del material histopatológico.

Al Dr. Guillermo Valdivia y al personal del laboratorio DIVET, por su colaboración para desarrollar la técnica de ELISA.

Al Dr. Tonatiuh Cruz, por su ayuda con la técnica de inmunofluorescencia.

Al MC Atalo Martínez, del CENID-Microbiología, por la capacitación en el cultivo celular.

Al Dr. José Simón Martínez y al Dr. Raúl Fajardo, de la UAEM, por sus aportaciones al presente trabajo.

Al eMVZ Carlos Saavedra y al Sr. Rafael Sánchez Chávez, responsable del programa de suministro y control de material biológico de FES C, campo 4; por su apoyo con el manejo de los animales.

A mis compañeros de la maestría: Jaime, Jacobo, Fabiola, Eli, Gerardo, César, Néstor, Angel, Aleyda, Lupita y Tábata. Gracias por hacer más placentera la estancia.

Especialmente, y con todo mi amor y respeto, al Dr. Juan Carlos Del Río García; por ayudarme de todas las formas posibles a cumplir esta meta.

RESUMEN

El moquillo canino es una de las enfermedades virales más importantes de los perros, en quienes la morbilidad y mortalidad pueden ser elevadas a pesar de la vacunación y el tratamiento es de carácter sintomático. El factor de transferencia (FT) es considerado un potente inmunomodulador que ha demostrado un efecto benéfico en algunas enfermedades infecciosas; por tal motivo se propone en el presente trabajo que puede resultar útil como tratamiento en la infección por el virus del moquillo canino, modificando la respuesta inmune en beneficio de los animales afectados. En esta investigación se estudió el efecto terapéutico e inmunológico del FT específico en cachorros de perro infectados experimentalmente con el virus del moquillo canino. Para tal efecto se utilizaron 20 perros mestizos, de entre 3 y 6 meses de edad y distribuidos al azar en uno de los 5 grupos experimentales: grupo A control negativo, grupo B sin infección y con tratamiento de FTe (de origen porcino), grupo C con infección y sin tratamiento, grupo D con infección y con tratamiento de FTe, grupo E con infección y con tratamiento de FTne (de origen humano). Se obtuvieron muestras de sangre de todos los animales los días 1, 5, 10, 17, 25 y 32 post-infección y se realizó el conteo total y diferencial de leucocitos, hematocrito y proteínas plasmáticas. Se calculó mediante citometría de flujo la cantidad de células que expresaban los marcadores CD3+/CD4+ y CD3+/CD8+. Se realizó una evaluación clínica durante 33 días consecutivos. Se determinó la cantidad de IgG anti-CDV semanalmente. A los 33 días se realizó la eutanasia para efectuar la necropsia y evaluar las lesiones causadas por el virus y el posible efecto del FT. Se compararon los resultados entre los grupos mediante análisis de varianza y prueba de Tukey con un 95% de confianza. El tratamiento con FT no modificó la presentación clínica de la enfermedad ni la producción de anticuerpos. Los linfocitos T CD4+ tampoco mostraron alteración. Sin embargo, sí se observó un aumento estadísticamente significativo ($p=0.05$) en la cantidad de leucocitos, linfocitos totales y linfocitos T CD8+ en los grupos D y E que fueron infectados y tratados con FT. De igual modo se observó un efecto benéfico al disminuir la frecuencia y severidad de las lesiones histológicas causadas por el CDV al administrar FTne. Los resultados obtenidos en este trabajo apoyan el uso de FT como terapéutico auxiliar en el tratamiento de la infección por virus de moquillo canino, al modificar de manera favorable la respuesta inmune.

Palabras clave: moquillo canino, factor de transferencia, extracto dializable de leucocitos.

ABSTRACT

The canine distemper is one of the most important viral disease of dogs, morbidity and mortality can be high in spite of the vaccination and treatment is symptomatic in nature. The transfer factor (TF) is considered a potent immunomodulator that has shown a beneficial effect in some infectious diseases, for that reason it is proposed in this paper that may prove useful as a treatment for canine distemper virus infection, modifying the immune response in the interests of affected animals. This research studied the therapeutic and immunological effect of TF on pups experimentally infected with CDV. To that effect were used 20 crossbred dogs of between 3 and 6 months of age and randomly distributed into one of 5 experimental groups: Group A negative control, group B without infection and with TFe treatment (porcine origin), group C with CDV infection and without treatment, group D with CDV infection and treatment of TFe, group E with CDV infection and treatment of TFne (human origin). Aiming to evaluate the effect of CDV infection and / or treatment with TF were obtained blood samples from all animals on days 1, 5, 10, 17, 25 and 32 post-infection and was held countdown total and differential leukocyte count, hematocrit, plasma proteins. Was calculated by flow cytometry the number of cells expressing markers CD3 + / CD4 + and CD4 + / CD8+. Clinical evaluation was performed for 33 consecutive days. It was determined the amount of IgG anti-CDV weekly. For the 33 days was performed euthanasia for necropsy and assess injuries caused by the CDV and the possible effect of the TF. The results were compared among groups by analysis of variance and Tukey test with 95% confidence. Treatment with TF did not change the clinical presentation of the disease or the production of antibodies. CD4 + T cells showed no change. However, it was found a statistically significant increase ($p = 0.05$) in the amount of leukocytes, lymphocytes and CD8 + T cells in groups D and E were infected and treated with TF. Similarly there was a beneficial effect by reducing the frequency and severity of the histopathological lesions caused by CDV to manage TF. The results of this study support the use of TF as therapeutic aids in the treatment of infection with canine distemper virus, favorably modify the immune response.

Keywords: canine distemper, transfer factor, dialyzable extract of leukocytes.

ÍNDICE

	Página
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. REVISIÓN DE LA LITERATURA.....	2
2.1.. Moquillo canino.....	2
2.1.1. Etiología.....	2
2.1.2. Epizootiología.....	4
2.1.3. Patogenia y signos clínicos.....	5
2.1.4. Diagnóstico.....	7
2.1.5. Tratamiento y control.....	9
2.1.6. Inmunidad frente al virus.....	11
2.2. Inmunomodulación.....	12
2.2.1. Factor de transferencia.....	13
2.2.1.1. Estructura química.....	15
2.2.1.2. Mecanismo de acción.....	16
2.2.1.3. Uso terapéutico.....	17
3. OBJETIVOS.....	18
3.1. General.....	18
3.2. Particulares.....	18
4. HIPÓTESIS.....	19
5. MATERIAL Y MÉTODOS.....	20
5..1. Diseño experimental.....	20
5.2. Animales de experimentación.....	20
5.3. Infección experimental.....	21
5.4. Factor de transferencia.....	22
5.5. Evaluación clínica.....	23

5.6. Inmunofluorescencia directa.....	24
5.7. Biometría hemática	24
5.8. Determinación de subpoblaciones de linfocitos T.....	25
5.9. Determinación de anticuerpos.....	26
5.10. Examen post-mortem.....	27
5.11. Aislamiento viral.....	28
5.12. Análisis estadístico.....	28
6. RESULTADOS.....	29
6.1. Evaluación clínica.....	29
6.2. Inmunofluorescencia	31
6.3. Biometría hemática	32
6.4. Determinación de subpoblaciones de linfocitos T.....	38
6.5. Determinación de anticuerpos.....	39
6.6. Examen post-mortem.....	41
6.7. Aislamiento viral.....	44
7. DISCUSIÓN.....	45
8. CONCLUSIONES.....	52
9. LITERATURA CITADA.....	53
10. ANEXOS	60
10.1. Formato de hoja clínica.....	60
10.2. Solución de lisis para eritrocitos.....	60
10.3. Histogramas de citometría de flujo.....	60
10.4. Lesiones macro y microscópicas causadas por CDV.....	61
10.5. Efecto citopático producido por CDV.....	62

LISTA DE CUADROS

	Página
Cuadro 1. Patogenia de la infección por CDV.	5
Cuadro 2. Diseño experimental, asignación de grupos.	20
Cuadro 3. Escala para evaluación clínica.	23
Cuadro 4. Escala para evaluación histopatológica.	27
Cuadro 5. Signología clínica en cachorros inoculados con CDV.	29
Cuadro 6. Hallazgos histológicos en cachorros inoculados con CDV.	42

LISTA DE FIGURAS

	Página
Fig. 1 Genoma del virus de moquillo canino	3
Fig. 2 Esquema de paramixovirus.	4
Fig. 3 Frecuencia de signología clínica por día.	30
Fig. 4 Temperatura rectal.	31
Fig. 5 Resultado de la prueba de inmunofluorescencia directa.	31
Fig. 6 Conteo total de leucocitos.	32
Fig. 7 Cantidad de neutrófilos.	33
Fig. 8 Cantidad de linfocitos.	34
Fig. 9 Gráfica de cantidad linfocitos.	34
Fig. 10 Cantidad de monocitos.	35
Fig. 11 Cantidad de eosinófilos	36
Fig. 12 Hematocrito.	37
Fig. 13 Proteínas plasmáticas.	37
Fig. 14 Porcentaje de linfocitos CD4+.	38
Fig. 15 Porcentaje de linfocitos CD8+.	39
Fig. 16 Concentración de IgG anti-CDV.	40
Fig. 17 Gráfica de la concentración de IgG anti-CDV.	41
Fig. 18 Comparación de medias para lesión histológica.	43
Fig. 19 Grado de lesión histológica.	43

Fig. 20	Histogramas de citometría de flujo.	60
Fig. 21	Lesiones macro y microscópicas causadas por infección experimental con CDV	61
Fig. 22	Efecto citopático producido por CDV	62

1. INTRODUCCIÓN

El moquillo canino es una de las enfermedades virales más importantes de los perros domésticos, además de afectar a otras especies animales. Provoca morbilidad y mortalidad elevadas. La presencia de animales recién infectados mantiene el virus entre la población canina, particularmente si se toma en cuenta que algunos individuos cursan con enfermedad subclínica; además, el nacimiento constante de cachorros ayuda a proporcionar un grupo de animales susceptible a la infección (Appel y Summers, 1999; Green y Appel, 2000). El virus del moquillo canino (CDV, del inglés *canine distemper virus*) afecta severamente la inmunidad ya que infecta e induce apoptosis de los leucocitos y esto conlleva a los pacientes a un estado mayor de susceptibilidad frente a patógenos oportunistas. El control de la enfermedad se realiza mediante la vacunación, generalmente con vacunas de virus vivo modificado; sin embargo se han informado en diferentes países, brotes de la enfermedad en perros vacunados, lo cual sugiere que actualmente hay cierta diversidad genética del CDV de campo (Keawcharoen *et al.*, 2005; Uema *et al.*, 2005; Kapil *et al.*, 2008; Simón-Martínez *et al.*, 2008). No existe un tratamiento efectivo contra la infección, por lo cual el plan terapéutico es sintomático y de sostén, basado en la administración de antibióticos de amplio espectro para combatir las infecciones secundarias bacterianas, administración de soluciones parenterales para corregir el desequilibrio hidroelectrolítico, antiinflamatorios y anticonvulsivos, estos últimos con un bajo grado de eficacia (Greene y Appel, 2000).

El FT ha demostrado ser un tratamiento efectivo en enfermedades que afectan individuos inmunodeprimidos y contra diversas enfermedades infecciosas en humanos y animales (Estrada *et al.* 1999), por lo tanto es probable que resulte en un efecto benéfico para controlar la infección por el virus del moquillo canino.

2. REVISIÓN DE LA LITERATURA

2.1. Moquillo canino.

El moquillo canino, también conocido como “distemper” o enfermedad de Carré, es una de las enfermedades virales más importantes de los perros domésticos, produciendo morbilidad y mortalidad elevadas en todo el mundo. La enfermedad se conoce desde 1760, fue descrita por primera vez en 1809 por Edward Jenner; en 1905 Carré sugirió la etiología viral, y en 1926 Dunkin y Laidlaw lo confirmaron (Appel 1969; Murphy *et al.*, 1999).

La enfermedad afecta a todas las especies de la familia *Canidae* (perro, zorro, coyote, lobo, etc.), *Procyonidae* (mapache, coatí, panda menor), *Mustelidae* (hurón, visón, marta, mofeta, nutria), *Ursidae* (osos), *Hienidae* (hienas), afecta también algunos miembros grandes de la familia *Felidae* (león, leopardo, tigre, guepardo) y al pecarí de collar. Existen otros paramixovirus como el morbilivirus de los cetáceos y el distemper focino que afectan a mamíferos acuáticos (focas, delfines, marsopa), y los virus Hendra y Nipah que afectan equinos y cerdos respectivamente; todos ellos están muy relacionados con el virus de moquillo canino (CDV, del inglés *canine distemper virus*) y se cree que pudieron haber evolucionado a partir de éste (Barclay, 2000; Greene y Appel, 2000; Lednicky *et al.*, 2004; Fauquet *et al.*, 2005).

2.1.1. Etiología.

El CDV pertenece a la familia *Paramyxoviridae*, género *Morbillivirus*, donde se encuentra junto con los virus de sarampión, peste bovina, peste de los pequeños rumiantes, distemper focino y morbilivirus de cetáceos (Carter *et al.*, 2005, Fauquet *et al.*, 2005). Existe un sólo serotipo, pero las cepas difieren en virulencia. Es un virus envuelto de 150 a 250 nm, que contiene una cadena simple de RNA en sentido negativo y que posee simetría helicoidal. La Figura 1 presenta un esquema del genoma del CDV, que codifica para las proteínas que constituyen la partícula viral; dos glucoproteínas: una hemaglutinina (H) y una proteína de fusión (F); posee además proteínas de matriz (M), una nucleocápside (NP) que provee

protección al genoma, una transcriptasa (L), una polimerasa (P) encargadas estas 2 de la transcripción del RNA (Pringle 1999, Fauquet *et al.*, 2005).

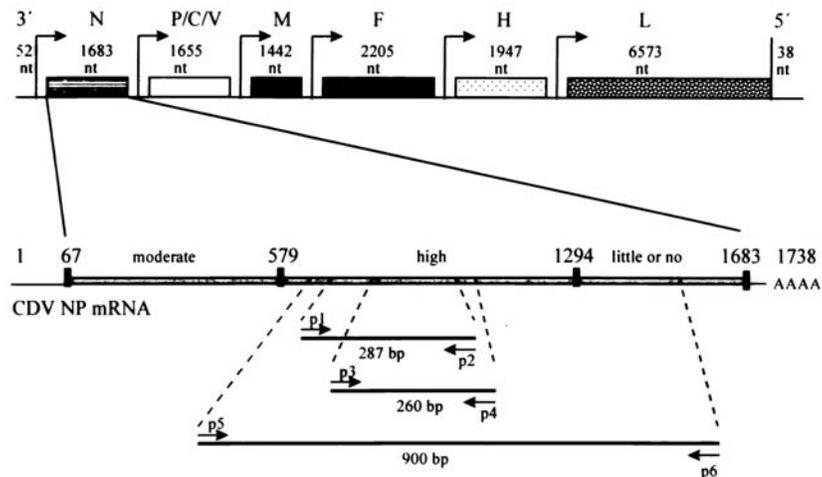


Figura 1. GENOMA DEL VIRUS DE MOQUILLO CANINO [Frisk *et al.*, 1999].

En la Figura 2 se muestra la estructura del virus. La hemaglutinina y la proteína F facilitan la unión del virus a las membranas celulares del hospedero, esta última proteína media además la fusión de la envoltura viral con la membrana; también es responsable de la formación de sincitios, lo cual le permite al virus diseminarse sin exponerse a los anticuerpos. La hemaglutinina tiene una interacción específica con el receptor celular, por lo tanto es responsable del tropismo selectivo del virus y es importante para la liberación de las partículas virales. La proteína M es importante para la maduración del virus, sirve como enlace entre la nucleocápside y las proteínas de superficie (H y F) (Fenner, 1992; Diallo, 1990; Barret, 1999; Murphy *et al.*, 1999; Greene y Appel, 2000).

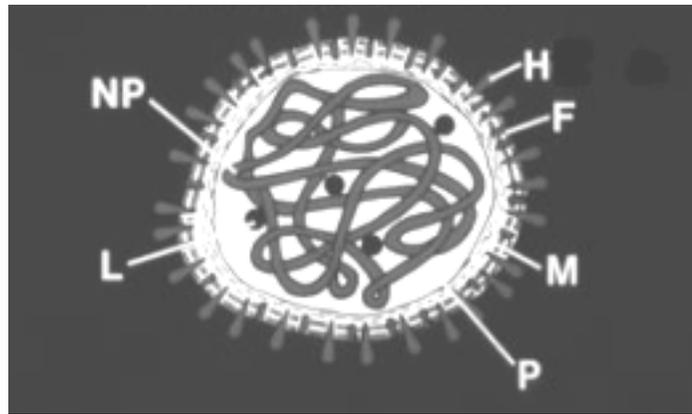


Figura 2. ESQUEMA DE UN PARAMIXOVIRUS. COMPONENTES DE LA ENVOLTURA: **H** HEMAGLUTININA, **F** PROTEÍNA DE FUSIÓN, **M** PROTEÍNA DE MATRIZ; COMPONENTES NUCLEARES: **P** POLIMERASA, **L** PROTEÍNA GRANDE, **NP** NUCLEOCÁPSIDE. (Tomado de Appel y Summers, 1999)

Se ha encontrado que la molécula señaladora de activación de los linfocitos (CD150 ó SLAM, del inglés *Signaling lymphocyte activation molecule*) actúa como receptor celular para el CDV y otros morbilivirus, esta molécula de superficie es abundante en los linfocitos y en las células dendríticas (Tatsuo *et al.*, 2001; Kouomou *et al.*, 2002; Seki *et al.*, 2003; Lan *et al.*, 2005).

2.1.2. Epizootiología.

Es una enfermedad altamente contagiosa; los perros de todas las edades son susceptibles a CDV, especialmente los cachorros cuando pierden los anticuerpos maternos. Los animales infectados en forma aguda eliminan al virus a través de todas las secreciones corporales a partir de los 7 días post infección (PI), independientemente de la presencia o no de signos clínicos; durante la fase aguda de la enfermedad continúan eliminando virus. La ruta más importante de transmisión es a través de los aerosoles de las secreciones respiratorias. Los perros que se recuperan después de la infección por el CDV son inmunes de por vida (Appel y Summers, 1999). La mortalidad va del 30 al 80% (Fenner, 1992; Greene y Appel, 2000).

2.1.3. Patogenia y signos clínicos.

En el Cuadro 1 se indica la localización del virus en los tejidos de acuerdo al avance de la infección, lo cual se relaciona directamente con la signología mostrada por los animales.

Cuadro 1. PATOGENIA DE LA INFECCIÓN POR CDV (Adaptado de Appel, 1969).

Días post-infección	Localización del virus / aparición de lesiones
1	Células mononucleares de tonsilas y linfonodos bronquiales
2	Tonsilas, linfonodos bronquiales, médula ósea, timo, bazo, linfonodos retrofaríngeos
3, 4	Bazo, estómago, intestino, linfonodos mesentéricos, células de Kupffer
5, 6	Timo, médula ósea, linfonodos, bazo, leucocitos de sangre periférica, bronquios y alveolos, nasofaringe y mucosa conjuntival
9	Piel (incluyendo cojinete plantar), glándulas exócrinas y endócrinas, tractos digestivo, respiratorio, urinario y reproductivo, células mononucleares localizadas en la adventicia de vasos sanguíneos, y meninges
14, 16	Mononucleares en líquido cefalorraquídeo y espacio perivascular, células gliales y neuronas en cerebelo, corteza cerebral, ganglio basal, hipocampo y médula espinal
15 - 30	Distribución generalizada en animales sin anticuerpos
40 y 60	Encefalitis demielinizante

Los viriones se unen a los receptores específicos localizados en la membrana celular y penetran mediante la fusión de la envoltura viral con la superficie de la célula hospedera en un pH neutro. La infección inicial ocurre en las células epiteliales y tejido linfoide de la nasofaringe, y la replicación primaria tiene lugar en el tejido linfoide del tracto respiratorio. A los 3-6 días postinfección se observa fiebre transitoria asociada con viremia, y ocurre una leucopenia severa por apoptosis, causando disminución de las células CD3+ (linfocitos T), CD4+ (neutrófilos y linfocitos T cooperadores), CD8+ (linfocitos T citotóxicos), CD21+ (linfocitos B) y CD14+ (monocitos) sin que el virus sea detectable en las células apoptóticas (Schobesberger *et al.*, 2005). Una segunda fase de fiebre alta se presenta entre los 14 y los 18 días, cuando los perros no desarrollan anticuerpos con un título mayor de 1:100. Ocurre entonces la infección de los leucocitos y de las células epiteliales en todo el organismo, además de infectar neuronas y células gliales en el sistema nervioso central (SNC); en este momento se observa el inicio de la fase sintomática de la enfermedad, caracterizada por descarga nasal serosa, conjuntivitis y anorexia. Pueden presentarse enseguida signos respiratorios y gastrointestinales, que frecuentemente están complicados

con infecciones bacterianas secundarias, generalmente hay diarrea sanguinolenta; puede ocurrir encefalomiелitis aguda al mismo tiempo o inmediatamente después de los signos sistémicos. El grado de linfopenia correlaciona con la severidad de la enfermedad, la colonización del SNC por el virus y la persistencia en el tejido linfoide. Los animales más gravemente enfermos se mantienen leucopénicos durante todo el curso de la enfermedad (Appel, 1969; Greene y Appel, 2000; Wünschmann *et al.*, 2000; Koutinas *et al.*, 2002). Normalmente el virus desaparece cuando los perros desarrollan anticuerpos; sin embargo, en algunos animales el virus permanece en las neuronas y en las células epidérmicas de los cojinetes plantares. En estos casos ocurre signología de las fases tardías: una hiperqueratosis de los cojinetes plantares y plano nasal, así como signos relacionados con una encefalitis desmielinizante crónica (Appel, 1969; Murphy *et al.*, 1999; Greene y Appel, 2000; Stein *et al.*, 2004; Engelhardt *et al.*, 2005). La desmielinización coincide con la replicación del CDV en las células gliales de la sustancia blanca; sin embargo, el mecanismo exacto de la desmielinización se desconoce, ya que no hay evidencia de replicación viral en los oligodendrocitos, las células productoras de mielina (Vandeveld, 2004). Existen datos que sugieren que tanto los leucocitos como las plaquetas participan en el transporte del virus al SNC a través del endotelio vascular (Krakowka, 1989). Dependiendo de la cepa viral, los signos pueden relacionarse más con la enfermedad aguda que afecta la sustancia gris o con la enfermedad subaguda que lesiona la sustancia blanca. Ataques convulsivos y mioclonía con hiperestesia y depresión predominan en la primera; mientras que la incoordinación, ataxia, paresia, parálisis y temblores musculares en la segunda. Los signos meníngeos de hiperestesia y rigidez cervical pueden ser vistos en ambas presentaciones. Son frecuentes la neuritis óptica y las lesiones de la retina en los perros infectados con CDV (Appel y Summers, 1999).

Los signos clínicos varían de acuerdo con la virulencia de la cepa, las condiciones ambientales, la edad y el estado inmunitario del animal. Son comunes las formas leves de la enfermedad con signología inespecífica: fiebre, apatía, hiporexia e infecciones del tracto respiratorio superior. Las cepas virales que inducen infección aguda fatal afectan predominantemente la sustancia gris del SNC y provocan destrucción neuronal. A las 3

semanas postinfección (PI) los perros o han muerto o se han recuperado totalmente. Las cepas virales que causan una enfermedad más leve afectan la sustancia blanca del SNC causando desmielinización, en ese caso la recuperación o la muerte puede demorarse por 2 ó 3 meses. Es posible la presencia de signos nerviosos, sin otros signos previos de enfermedad generalizada (Vandevelde y Zurbriggen, 1995). Damián *et al.* (2005) realizaron un estudio en México donde por medio de inmunohistoquímica detectaron CDV en un 77% de animales que fallecieron con diagnóstico de neumonía aguda o subaguda.

2.1.4. Diagnóstico.

El diagnóstico clínico suele realizarse con base en los signos e historia clínicos; sin embargo, el diagnóstico de laboratorio es necesario para descartar otras enfermedades. En casos agudos se observa leucopenia con linfopenia, pueden hallarse antígenos virales detectados por técnicas inmunocitoquímicas y cuerpos de inclusión en células blancas, improntas vaginales o conjuntivales, células procedentes de lavado bronquial, sedimentos urinarios o líquido cefalorraquídeo (LCR). En los casos subagudos o crónicos estas pruebas pueden resultar negativas (Saito *et al.*, 2006).

Se han utilizado pruebas serológicas en muestras pareadas, mediante las técnicas de virus neutralización y de ELISA. La detección de anticuerpos neutralizantes, precipitantes o citotóxicos no es suficiente para el diagnóstico. Los perros infectados en forma aguda pueden morir antes de la aparición de los anticuerpos neutralizantes, mientras que los infectados en forma subaguda o crónica pueden tener niveles de anticuerpos comparables con los de los perros vacunados. La prueba de ELISA para la detección de IgM específica es una prueba útil, ya que la IgM en los perros infectados persiste entre 5 semanas y 3 meses, dependiendo de la cepa y la respuesta del hospedero. En los perros vacunados la IgM persiste por aproximadamente 3 semanas (Appel y Summers, 1999; von Messling *et al.*, 2003).

La inmunofluorescencia (IF) es útil para demostrar la presencia del antígeno viral en el epitelio conjuntival, linfocitos, pulmón, estómago, intestino y vejiga urinaria (Greene y Appel, 2000).

Las técnicas de biología molecular están siendo usadas para el diagnóstico de la enfermedad, tal es el caso de la reacción en cadena de la polimerasa-transcriptasa reversa (RT-PCR), la cual muestra alta especificidad y sensibilidad. Se está utilizando también la PCR anidada para detectar cantidades muy bajas de los ácidos nucleicos del virus en las muestras clínicas. Las muestras utilizadas para este tipo de pruebas diagnósticas pueden ser leucocitos, suero sanguíneo, líquido cefalorraquídeo y orina (Barret, 1999; Frisk *et al.*, 1999; Saito *et al.*, 2006; Simon-Martínez *et al.*, 2008). Algunos investigadores sugieren que la muestra de mucosa conjuntival puede ser la más adecuada para el diagnóstico antemortem (Kim *et al.*, 2006).

Morfopatología:

Macroscópicamente la única lesión consistente y característica es la atrofia del timo, que puede ser vista después de los 9 días postinfección. A nivel histológico se observa depleción linfoide severa, a veces sin evidencia de necrosis, neumonía intersticial, enteritis que va de mucosa a hemorrágica, encefalitis aguda o crónica con demielinización. Se pueden observar en los epitelios mucosos, leucocitos, células gliales y neuronas, cuerpos de inclusión intracitoplasmáticos e intranucleares, acidófilos, que miden de 1 a 5 micras. La formación de células gigantes en el SNC, linfonodos, pulmón y leptomeninges, puede ayudar a establecer el diagnóstico, ya que es una característica de los paramixovirus (Appel, 1969; Greene y Appel, 2000).

Aislamiento viral:

El aislamiento del virus se realiza mediante la inoculación de cultivos de linfocitos o macrófagos con macerados de tejidos infectados procedentes del animal sospechoso. En un lapso de 2 a 5 días se detecta el efecto citopático característico (formación de sincitios), entonces el virus se puede aislar mediante pases a otras células, tales como las MDCK

(células epiteliales de riñón canino), Vero (células de riñón de mono verde africano) y macrófagos pulmonares. Si no se observa efecto citopático, los cultivos se examinan con anticuerpos fluorescentes (Fenner 1992; Murphy *et al.*, 1999; Greene y Appel, 2000; Lednicky *et al.*, 2004). La línea celular B95a (linfocitos B de marmota) se ha utilizado para hacer cultivos del CDV y los investigadores reportan mayor eficiencia respecto de otras líneas celulares; sin embargo, no es fácilmente disponible (Seki *et al.*, 2003; Lednicky *et al.*, 2004; Nishi *et al.*, 2004). Recientemente se han utilizado con éxito cultivos de células Vero que han sido transfectadas para que expresen el receptor del virus, SLAM. Se observa efecto citopático a las 24 horas post-inoculación con tejido esplénico de animales diagnosticados clínicamente. Se sabe que la virulencia del CDV puede disminuir cuando éste se adapta a los cultivos celulares (Tatsuo *et al.*, 2001; Kouomou y Wild, 2002; Seki *et al.*, 2003; Lan *et al.*, 2005).

2.1.5. Tratamiento y control.

No existen drogas antivirales específicas para el CDV, por lo cual el tratamiento es de sostén. Se indica la terapia antibiótica debido a las infecciones bacterianas secundarias, especialmente del tracto respiratorio y digestivo. Ya que con frecuencia los perros con moquillo canino están deshidratados, la administración de fluidos y electrolitos puede ser la terapia de mayor importancia (Appel y Summers, 1999). Se han utilizado con éxito tratamientos inmunomoduladores como el factor de transferencia, aunque hacen falta más estudios al respecto (Calzada, 1998).

El tratamiento de perros con signos neurológicos no es satisfactorio. Los sedantes y anticonvulsivos pueden mejorar los signos clínicos, pero no tienen efecto curativo. Si los signos nerviosos son progresivos, se aconseja la eutanasia (Appel y Summers, 1999).

La medida de control más importante es la prevención. La inmunización eficaz de los cachorros depende de la ausencia de anticuerpos maternos. Las vacunas inactivadas que estuvieron disponibles desde la década de los 40, no controlaron la enfermedad en perros. Un cambio notable se observó en los años 60, cuando aparecieron las vacunas de virus vivo

modificado (VVM), aunque en ocasiones pueden causar encefalitis postvacunal que provoca signos nerviosos tales como cambios en el comportamiento, convulsiones y ceguera alrededor de 1 a 2 semanas posteriores a la inmunización, con una alta tasa de mortalidad. Las cepas virales adaptadas a células aviares son más seguras para perros, aunque es posible que no todos los animales susceptibles sean protegidos. Cualquier vacuna del tipo modificado puede ser fatal para otros animales salvajes y de zoológico, para estas especies deben utilizarse vacunas de virus inactivado. Actualmente está disponible en el comercio una vacuna recombinante elaborada en virus de viruela del canario que expresa las proteínas H y F del CDV, tiene un alto rango de seguridad y eficacia. En Europa, se ha desarrollado recientemente una vacuna de DNA basada en secuencias de CDV virulento y los estudios preliminares han mostrado su eficacia en presencia de anticuerpos maternos. De cualquier modo, es difícil igualar la eficiencia y la duración de la inmunidad de las vacunas elaboradas con virus vivo modificado utilizadas actualmente (Appel y Summers, 1999; Barret, 1999; Murphy *et al.*, 1999; Greene y Appel, 2000; von Messling *et al.*, 2003; Griot *et al.*, 2004].

Además de la vacunación, el aislamiento estricto de los animales con CDV parece ser la etapa más importante en el control de la enfermedad. El contacto directo de perros infectados a perros susceptibles parece ser la vía principal de diseminación viral. La desinfección del medio ambiente puede ser lograda con productos de uso común, ya que el virus es destruido rápidamente fuera del hospedero (Greene y Appel, 2000).

A pesar de la vacunación, en los últimos años se ha informado de brotes de la enfermedad en perros vacunados de diferentes países. Esto sugiere cierta diversidad genética del CDV de campo; actualmente, en Japón se han aislado 23 cepas genéticamente diferentes de 1982 a 1998 (Keawcharoen *et al.*, 2005; Uema *et al.*, 2005, Kapil *et al.*, 2008). En México se ha demostrado la presencia de al menos 2 variedades genéticas del CDV (Simón-Martínez *et al.*, 2008).

2.1.6. Inmunidad frente al virus.

Los virus son microorganismos intracelulares obligados que se replican en el interior de las células, usando a menudo los ácidos nucleicos y la maquinaria de síntesis protéica del hospedero. Infectan característicamente a una amplia variedad de poblaciones celulares mediante la utilización de moléculas de superficie normales existentes en la membrana de las células como receptores para penetrar en ellas. La replicación vírica interfiere en la síntesis y la función protéica celular normal, lo que origina una lesión y en último término la muerte de la célula infectada. Esto da por resultado el efecto citopático producido por los virus y se dice que la infección es “lítica” porque se lisa la célula infectada. Los virus no citopatogénicos pueden causar infecciones latentes, en las que el ácido nucleico vírico persiste en las células del hospedero y produce proteinasas que pueden alterar las funciones celulares (Murphy *et al.*, 1999).

Las respuestas inmunitarias innatas y adaptativas frente a los virus tienen como objetivo bloquear la infección y eliminar las células infectadas. Los mecanismos principales de la inmunidad innata son la inhibición de la infección por los interferones (IFN) de tipo I y la eliminación de las células infectadas por los linfocitos NK (*Natural killer*, asesinas naturales). La inmunidad adaptativa depende de los anticuerpos, que bloquean la unión del virus a la célula hospedera y su entrada en ella; y de los linfocitos T citotóxicos, que combaten la infección mediante la destrucción de las células infectadas (Tizard, 2002; Abbas y Lichtman, 2004; Lednicky *et al.*, 2004; Male *et al.*, 2007).

En el caso del moquillo canino se sabe que los anticuerpos contra las proteínas del *core* viral (NP y P) pueden determinarse por ELISA o precipitación a los 6 - 8 días PI. Los anticuerpos contra las proteínas de la cápside (H y F) aparecen entre 10 y 20 días PI dependiendo de la cepa viral. Estos anticuerpos neutralizantes persisten durante años. La IgM específica determinada por ELISA aparece entre los 6 y 8 días, y hasta los 3 meses PI, de acuerdo con la severidad de la infección y la cepa viral (la IgM en perros vacunados permanece por aproximadamente 3 semanas). La inmunidad mediada por células representada por linfocitos T citotóxicos circulantes, aparece entre los 10 y 14 días PI y

alcanza su pico máximo entre los 14 y 28 días PI. Posteriormente disminuyen gradualmente y desaparecen entre las 6 y las 10 semanas PI. Los perros que desarrollan la enfermedad aguda o subaguda desarrollan muy pobre o nula respuesta inmune humoral y celular. Los perros con infección crónica del SNC pueden desarrollar una fuerte respuesta inmune en forma tardía. El líquido cefalorraquídeo (LCR) de los perros recuperados rápidamente usualmente no posee anticuerpos ni interferón. Los perros que mueren después de una infección aguda del SNC tienen interferón en el LCR pero no tienen anticuerpos neutralizantes. Los que desarrollan la enfermedad subaguda o crónica con signos nerviosos tienen interferón y pueden tener anticuerpos neutralizantes en el LCR. La contribución de la respuesta inmune al desarrollo temprano de lesiones no es clara. A pesar de la severa inmunodepresión y la falta de infiltrado perivascular, numerosas células CD8+ y altas concentraciones de IL-8 son encontradas en las lesiones desmielinizantes agudas y difusas en el parénquima cerebral, correlacionando fuertemente con áreas de infección viral. Esto puede significar que la activación inicial de las células microgliales que ocurre en el moquillo puede desencadenar la invasión de células T al SNC. Se ha demostrado claramente que la inflamación del tejido puede eliminar el virus (Vandeveldel y Zurbriggen, 1995; Wünschmann *et al.*, 2000; von Messling *et al.*, 2003; Kapil *et al.*, 2008).

2.2. Inmunomodulación.

Las sustancias inmunomoduladoras, que pueden ser de origen diverso, tienen la capacidad de regular la respuesta inmune, ya sea estimulándola o suprimiéndola. Los inmunoestimulantes son fármacos que reaccionan a diferentes niveles de la respuesta inmune, corrigiendo deficiencias inmunitarias y/o aumentando la resistencia del organismo; se les atribuyen funciones importantes en las inmunodeficiencias de algunos tipos de infecciones virales y bacterianas y en el tratamiento del cáncer. Desde el punto de vista clínico se designa como inmunoestimulante a toda sustancia que aumenta la resistencia del organismo a las diversas agresiones en donde el sistema inmune juega un papel de defensa (Lucero, 1996; Lunn y Rush, 2004).

Los inmunomoduladores pueden actuar específica o inespecíficamente y a diferentes niveles del sistema inmune, esto se debe a la necesidad de desarrollar agentes que puedan inhibir o intensificar selectivamente poblaciones o subpoblaciones de células para la respuesta inmune, tales como: linfocitos, macrófagos, neutrófilos, células NK y citotóxicas, o producir mediadores solubles como las citocinas (Martínez, 2005).

Una clasificación propuesta agrupa a los inmunoestimulantes, según su origen, en tres tipos: a) De origen microbiano, b) Sintéticos, y c) Fisiológicos. En Medicina Veterinaria se han utilizado inmunoestimulantes de los 3 grupos, algunos de ellos son: BCG, *Propionibacterium acnes*, *Parapoxvirus ovis*, levamisol, isoprinosine, acemannan, cimetidina, extractos de plantas (como *Aloe vera*, *Echinacea* sp., RS-100), caseína, IL-2, IFN-gamma, IFN-alfa, hormonas tiroideas, inmunoglobulinas y factor de transferencia. Las tendencias actuales están mucho más dirigidas a la investigación de inmunomoduladores presentes en la sangre o tejido linfoide, que aportan las células o sus productos y cuyas funciones propician la modulación de la respuesta inmune, así como de otras sustancias de origen natural que realicen estas funciones (King *et al.*, 1995; Calzada, 2000; Cano, 2001; Megid *et al.*, 2001; Uriel-Carmona *et al.*, 2002; Zaldivar *et al.*, 2002; Miranda *et al.*, 2005).

En pacientes clínicos la evaluación de la administración de inmunoestimulantes con frecuencia no se realiza, debido a que se utilizan durante el curso de la enfermedad y al hecho de que un solo fenómeno inmunológico no necesariamente correlaciona con la mejoría clínica. Es importante una evaluación más completa de las drogas inmunomoduladoras disponibles en veterinaria para evaluar sus efectos terapéuticos (Calzada, 2000; Lunn y Rush, 2004).

2.2.1. Factor de transferencia (FT).

El FT fue descubierto por Lawrence, quien en 1949 demostró que era posible transferir la respuesta inmunológica celular en humanos. En 1955 encontró que la hipersensibilidad retardada (DTH, *Delayed Type Hypersensitivity*) cutánea podía ser transferida utilizando extractos solubles de leucocitos provenientes de 20 mL de sangre total; en sus

experimentos, Lawrence (1954) utilizó lisados de leucocitos de donadores que presentaban reacciones DTH positivas a antígenos tales como coccidiodina, extracto diftérico y proteína M de estreptococo. Pocas horas después de haber recibido el extracto de leucocitos, los receptores eran capaces de presentar reacciones DTH positivas a los antígenos que eran reconocidos por los donadores y el efecto parecía ser antígeno específico. Al componente activo de estos extractos celulares se le llamó factor de transferencia, siendo considerado como un potente agente inmunoterapéutico principalmente en estados de inmunodeficiencia mediada por células (Estrada *et al.*, 1983; Estrada 1995). Lawrence dió a conocer que el FT podía pasar a través de una membrana de diálisis, sin perder su actividad biológica, en 1955 dializaron con un corte molecular de 20,000 Da y en 1963 con uno de 10,000 Da. El empleo de membranas con este corte molecular eliminaba la posibilidad de que el efecto fuese causado por anticuerpos (ya que el más pequeño de estos pesa alrededor de 150,000 Da); además se pensaba que estos dializados contenían sólo una especie molecular, hoy en día sabemos que la preparación que originalmente se llamó FT, es en realidad un conjunto de moléculas, llamadas extractos dializables leucocitarios o DLE, de sus siglas en inglés *dialyzable leukocyte extracts* (Lawrence, 1954 y 1983; Kirkpatrick, 1988 y 2000).

En la década de los 70's surge el interés por el DLE y los factores de transferencia en él contenidos, cuando se observó su aplicación en personas con ciertos síndromes de inmunodeficiencia de origen genético, mejoraba los parámetros clínicos e inmunológicos. Con ello se inició la investigación clínica de la aplicación del extracto de leucocitos dializado. En 1970, Levin demostró que el FT además de transferir la respuesta inmune celular (RIC) confería la capacidad de inducir la producción de linfocinas en respuesta a antígenos específicos, así como la resistencia a la infección en padecimientos con una inmunidad deficiente de carácter genético (Levin *et al.*, 1970; Wilson *et al.*, 1984; Dwyer, 1996).

El factor de transferencia es obtenido a partir de un proceso de lisis de los leucocitos y la separación de las moléculas celulares menores a 12,000 daltons. Tanto el DLE como el FT pueden obtenerse de leucocitos de sangre periférica, también de linfonodos, bazo, timo y

calostro. Este inmunomodulador es una sustancia soluble, liofilizable y es estable por varios meses a temperaturas de -70°C liofilizado; resiste el tratamiento con ADNasas, ARNasas, o tripsina, pero se inactiva a 56°C y es sensible a la luz directa del sol (Lawrence, 1983; Martínez-Cairo *et al.*, 1992; Rodríguez *et al.*, 2003).

Una unidad internacional de FT se define como la cantidad derivada del extracto de 1×10^8 leucocitos colocada en un volumen final variable; o bien una unidad de FT es aquella que se obtiene de los leucocitos de 450 ml de sangre de un sujeto sano (Kirkpatrick *et al.*, 1995; Estrada *et al.*, 1998; Franco *et al.*, 2004). Algunos investigadores comienzan a utilizar la dosificación con base en la cantidad de proteína del dializado (De la Fuente-Granada *et al.*, 2006).

2.2.1.1. Estructura química.

El FT es un derivado de linfocitos, es una familia de moléculas hidrofílicas altamente polares de bajo peso molecular, entre 3,500 y 6,000 daltons, que son producidas en pequeñas cantidades por las células linfoides y que poseen una potente actividad biológica. Los FT específicos son un conjunto de péptidos químicamente resistentes a la RNAasa, DNAasa y a diferentes proteasas. Algunas investigaciones sugieren que el FT contiene ribonucleótidos unidos a pequeños péptidos, originando una estructura de oligoribonucleopéptido constituido de una base de purina, ribosa, un grupo fosfodiéster y un péptido. La actividad biológica del factor de transferencia específico ha sido atribuida a un pequeño nucleopéptido de peso molecular de 1,600 daltons. El extracto citado se obtiene sometiendo a los leucocitos a un proceso de lisis, diálisis y/o ultrafiltración, se ha sugerido que se obtienen moléculas tales como timosina, nicotinamina, ascorbato, serotonina, prostanglandinas, interleucina 8, uracilo, factores de transferencia e hipoxantina. Hasta el momento se han podido determinar y aislar algunas de estas moléculas, así como fracciones del extracto y estudiar su papel en los efectos terapéuticos que se han observado al ser aplicados, tales como una fracción denominada inmunopéptido, responsable de la formación de rosetas de células T con eritrocitos de carnero; la fracción B consiste de 12 aminoácidos y de tres a cuatro bases de RNA (responsable de la hipersensibilidad retardada

a receptores no inmunes), y péptidos altamente polares, hidrofílicos y que constan de la siguiente secuencia conservada de aminoácidos LLYAQDL y LLYAQVEDN. Hasta el momento se han identificado algunas fracciones de esta molécula, así como efectos terapéuticos inducidos por éstas, como es la fracción conocida como inmunopéptido (Kirkpatrick, 1993; Estrada, 1995; Kirkpatrick, 2000; Rodríguez *et al.*, 2003).

2.2.1.2. Mecanismo de acción.

El factor de transferencia ejerce una acción directa sobre la producción de interleucina 1 y produce incremento en la activación de macrófagos, aumenta la síntesis de ADN de los linfocitos, promueve la quimiotaxis de monocitos y neutrófilos, aumenta la actividad de células NK, acelera la formación de rosetas de células T, aumenta el índice de poblaciones de linfocitos que reaccionan específicamente ante un antígeno, expande la población de dichos linfocitos y proporciona al individuo receptor la información para adquirir un estado de inmunidad celular, aumenta la citotoxicidad de células T contra antígenos tumorales, entre otros efectos. Se ha informado que modula la producción de citocinas como IL-2, TNF-alfa, IL-6 e IL-8 (Kreeger *et al.*, 1992; Alvarez-Thull y Kirkpatrick, 1996; Ojeda *et al.*, 2005). Se han propuesto varias hipótesis para explicar su mecanismo de acción: A) El FT forma parte del receptor de la célula T (TCR), siendo entonces necesario el FT para la activación de los linfocitos T cooperadores, ya que la activación se efectúa al unirse el antígeno a las moléculas clase II del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC, del inglés *Major Histocompatibility Complex*) de las células presentadoras de antígeno. B) El FT tiene la capacidad de promover la proliferación clonal de los linfocitos T. C) El FT incrementa la actividad quimiotáctica de los granulocitos y monocitos. D) El FT actúa como mitógeno acelerando la producción y diferenciación de las células del sistema inmune (Kirkpatrick 1989, 1993 y 2000; Mateos *et al.*, 1992; Dwyer, 1996).

Una de las características importantes del FT es que muestra especificidad, la cual está dada por los antígenos utilizados para inmunizar al donador, o con los que ha tenido contacto. De tal modo, el factor de transferencia específico transfiere la capacidad de tener una respuesta inmune celular contra el antígeno al que era sensible el donador, sin transferir la respuesta

inmune humoral. El FT específico (FTE) no parece tener efectos secundarios importantes en los pacientes y al no ser antigénico puede administrarse en repetidas ocasiones a los enfermos (Estrada *et al.*, 1983; Kirkpatrick *et al.*, 1995).

2.2.1.3. Uso terapéutico.

La mayoría de los estudios realizados en torno al FT se han hecho en humanos y se ha investigado y utilizado como agente terapéutico en muy diversas enfermedades infecciosas principalmente de origen viral y en segundo término las de origen bacteriano e infecciones parasitarias, autoinmunes, alérgicas y neoplásicas. Por lo cual se ha convertido en una excelente alternativa de la medicina actual. El FT ha sido aplicado con éxito en diversas enfermedades bacterianas como tuberculosis, lepra y brucelosis; parasitarias: leishmaniasis, toxoplasmosis y demodicosis; virales por ejemplo herpes simple y zoster, varicela y sarampión; micóticas: coccidioidomicosis y candidiasis; enfermedades inmunomediadas (asma y dermatitis atópica) y algunas neoplasias como melanoma, glioblastoma multiforme y carcinoma pulmonar (Estrada *et al.*, 1983; Salazar y Mejía, 1993; Ferrer *et al.*, 1994; Estrada, 1995; Fujisawa y Yamaguchi, 1996; Masi *et al.*, 1996; Cordero *et al.*, 1999; Morfin, 2003; Orozco *et al.*, 2004; Fabre *et al.*, 2004; Flores *et al.*, 2005; Pineda *et al.*, 2005; Luna *et al.*, 2007; Berrón *et al.*, 2007). A nivel experimental se han utilizado principalmente modelos murinos; ha mostrado resultados favorables en el tratamiento de shock endotóxico inducido por LPS en ratones; en otro trabajo redujo la replicación en cultivos de virus de inmunodeficiencia humana. En ambos trabajos se demostró disminución significativa de interleucinas proinflamatorias como factor de necrosis tumoral (TNF) e IL-8 (Fernández *et al.*, 2004; Franco *et al.*, 2004).

3. OBJETIVOS

3.1. General:

- Evaluar el efecto terapéutico e inmunológico de FT específico (FTe) en cachorros de perro infectados experimentalmente con CDV.

3.2. Particulares:

- Evaluar el efecto de FTe sobre la cantidad y tipo de leucocitos sanguíneos en cachorros con infección por CDV.
- Evaluar el efecto de FTe sobre la producción de anticuerpos contra CDV después de la infección.
- Evaluar el efecto de FTe sobre la evolución clínica de la infección por CDV.
- Evaluar el efecto de FTe sobre la presencia y severidad de lesiones por CDV en cachorros infectados.

4. HIPÓTESIS

La administración del FT específico tendrá un efecto positivo en la cantidad de leucocitos sanguíneos, la producción de anticuerpos específicos y la signología clínica, en cachorros infectados experimentalmente con el virus del moquillo canino.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1. Diseño experimental.

En el Cuadro 2 se señala la organización de los grupos experimentales; siendo el Grupo A el control negativo, sin infección y sin tratamiento; el Grupo B control del tratamiento, sin infección pero con tratamiento con FT específico; el Grupo C control de la infección, inoculado pero sin tratamiento con FT, los Grupos C y D fueron inoculados y tratados con FT específico y FT no específico, respectivamente.

Cuadro 2. DISEÑO EXPERIMENTAL

Grupo	Inoculación con CDV	Tratamiento con FT
A	NO	NO
B	NO	SI
C	SI	NO
D	SI	FT específico (FTe)
E	SI	FT no específico (FTne)

Se trabajó en dos periodos, en un primer tiempo los Grupos A y B no infectados; en el segundo los Grupos C, D y E infectados; de manera que se mantuvieran separados los animales infectados de los no infectados, para evitar el riesgo de contagio entre ellos.

5.2. Animales de experimentación.

Se utilizaron 20 perros, que fueron obtenidos del Centro de Control Canino de Cuautitlán, México, a partir de 4 camadas, sin importar raza o sexo. Al momento de iniciar el experimento tenían entre 3 y 6 meses de edad y peso corporal de 2 a 10 kg.

Los cachorros fueron mantenidos de 30 a 45 días antes del inicio para ser evaluados clínicamente, para asegurarse de que no tuvieran anticuerpos maternos y para ser sometidos a un programa de desparasitación interna y externa, ya que presentaban infestación severa

con ectoparásitos (*Ctenocephalides sp.*) y parásitos intestinales (*Toxocara sp.*, *Ancylostoma sp.* y *Dypilidium canis*). Se investigó la presencia de anticuerpos específicos contra moquillo canino utilizando la técnica de ELISA. Los animales sanos y negativos a la presencia de anticuerpos contra moquillo fueron asignados al azar a cada uno de los cinco grupos, de tal modo que cada grupo contara con 4 unidades experimentales.

Todo el tiempo que duró el trabajo experimental fueron mantenidos en las instalaciones de la FES-Cuautitlán Campo 4, UNAM, adecuadas para el alojamiento comunitario de perros y fueron manejados de acuerdo a las NOM-062zoo y NOM-033zoo. El proyecto fue aprobado por el Subcomité Institucional para el Cuidado de Animales en Experimentación (SICUAE) del Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal.

5.3. Infección experimental.

Se utilizó la cepa *Snyder Hill* del virus del moquillo canino (VR-526 ATCC, USA), el cultivo se realizó en células MA-104 (CRL-2378.1, ATCC, USA), utilizando botellas desechables para cultivo celular de 25 cm² (156340, Nunc, Dinamarca). Las células fueron mantenidas a 37°C, utilizando medio mínimo esencial (MEM) (ME-064, In Vitro, México), suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) (26140-079, GIBCO, USA), 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomina, 1 mM de piruvato de sodio, 2 mM de L-glutamina y 0.035% de bicarbonato de sodio.

Infección de los cultivos celulares: Cuando los monoestratos de células estaban subconfluentes (70 a 80% de confluencia) se desechó el medio de cultivo y se les adicionaron 200 µL del inóculo. Se incubaron a 37°C durante 60 minutos, agitando suavemente cada 10 minutos. Posteriormente se agregaron 7 mL de medio de cultivo adicionado con 2% de SFB. Los cultivos se incubaron y se observaron diariamente hasta ver el efecto citopático. Cuando al menos el 80% de las células presentaban efecto citopático (ECP) se sometía el cultivo a 3 ciclos de congelación / descongelación (-70°C /

37°C); se centrifugó a 1,500 g. durante 20 min. y se recuperó el sobrenadante, el cual fue considerado como la suspensión viral.

Titulación de virus: Se prepararon diluciones décuples con los sobrenadantes de los cultivos celulares infectados (después de la lisis celular) y fueron inoculadas en placas de cultivo de 96 pozos (Nunc, USA) en las que previamente se había establecido un monoestrato de células MA-104. Se observaron diariamente durante 7 días y se aplicó el método de Reed y Muench (1938) para calcular la dosis infectante del 50% del cultivo celular (TCID₅₀).

Se inoculó por vía intranasal a los animales de los Grupos C, D y E con 0.5 mL de una suspensión viral con un título de 1×10^4 TCID₅₀, de acuerdo con lo reportado en la literatura (Krakowka *et al.*, 1979; Kim *et al.*, 2006; von Messling *et al.*, 2003). Los individuos de los Grupos A y B recibieron solución salina fisiológica (SSF) por la misma vía y en la misma cantidad.

5.4. Factor de transferencia.

El biológico utilizado en este trabajo fue proporcionado por el Dr. Sergio Estrada Parra, del Departamento de Inmunología, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del IPN.

Se utilizó FT específico (FTe) de origen porcino, obtenido a partir de sangre de un animal hiperinmunizado contra CDV. El FTe liofilizado se mantuvo a -20°C y se reconstituyó al momento de usarlo con agua inyectable libre de pirógenos. Se utilizó también FT no específico (FTne) de origen humano (Transferón®). El FTne se mantuvo congelado a -20°C hasta el momento de aplicarlo.

A los animales de los Grupos B y D se les aplicó 1 Unidad / animal de FT específico de origen porcino (en un volumen de 0.5mL) por vía subcutánea cada uno de los días 10, 11, 12, 13, 15, 17, 19, y 25 post-infección. A los animales del Grupo E se les aplicó 0.1 Unidad por cada 6 kg de peso de FT no específico de origen humano (en un volumen de 0.2 a 0.8

mL) por vía subcutánea, los mismos días. A los animales de los Grupos A y C se les administró por vía subcutánea un volumen igual de agua inyectable.

5.5. Evaluación clínica.

Se tomó la temperatura corporal por vía rectal a cada uno de los animales entre las 9 y las 11 de la mañana, con un termómetro clínico digital (marca Citizen). La presencia de signología compatible con la enfermedad del moquillo canino se evaluó de la siguiente manera:

Cuadro 3. ESCALA PARA EVALUACIÓN CLÍNICA

Sin signología	(-)	0
Leve	(+)	1
Moderado	(++)	2
Severo	(+++)	3
Muy severo	(++++)	4

Los animales se observaron diariamente y se registraron los datos obtenidos en la hoja clínica (Anexo 1). Se consideró como levemente enfermos a los animales que presentaban al menos uno de los siguientes signos clínicos: disminución del apetito y de la actividad, presencia de descargas nasal y ocular serosas y escasas, estornudos y/o tos ocasional. La enfermedad moderada fue registrada cuando presentaban aumento de la temperatura rectal (más de 39.5°C), deshidratación menor al 5%, descargas nasal y ocular muco-purulentas escasas, tos y disnea. Se evaluó como severamente enfermos a los animales que presentaban fiebre (más de 40°C), deshidratación del 6 al 10%, descargas nasal y ocular abundante, o que tenían signología nerviosa como mioclonus, ataxia, nistagmus y que estaban postrados. El cuadro calificado como muy severo fue atribuido a los individuos que presentaban temperatura corporal arriba de 40.5°C, deshidratación superior al 10%, convulsiones, estado comatoso o muerte.

5.6. Inmunofluorescencia directa (IFD).

Se realizó la prueba de inmunofluorescencia en frotis conjuntival, para confirmar la presencia del antígeno viral el día 10 post-infección.

Procedimiento:

Con ayuda de un hisopo de algodón estéril humedecido en SSF se realizó un raspado suave de la conjuntiva parpebral inferior. El hisopo se giró sobre un portaobjetos limpio para depositar en él las células conjuntivales. Una vez realizado el frotis, la muestra se fijó por inmersión en acetona fría (4°C) durante 10 minutos. Se dejó secar y se mantuvo envuelto en papel aluminio a -20°C, hasta el desarrollo de la técnica. Para realizarla se añadieron 50 μL de un anticuerpo policlonal anti CDV conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) (VMRD Cat. 210-02-CDV). Se incubó durante 30 minutos a 37 °C en cámara húmeda. Se lavó 3 veces con solución amortiguadora de fosfatos (PBS). Se secó sobre un papel absorbente, se cubrió con un cubreobjetos aplicando unas gotas de PBS:glicerol (1:1) y se protegió de la luz hasta su observación en el microscopio de fluorescencia a 400x (Appel, 1969). Se utilizó un microscopio Carl Zeiss, modelo Axioskop 40 con lámpara UV HBO50/AC (USA), la imagen fue capturada por computadora en el programa Image Pro v. 4.0.

5.7. Biometría hemática (BH).

Se realizó los días 1, 5, 10, 17, 25 y 32 del experimento; el día 1 la muestra se obtuvo previo a la infección con el virus de moquillo.

Se tomaron muestras de sangre de cada uno de los perros, utilizando equipo para toma múltiple (Vacutainer) por punción de la vena yugular, que contenían EDTA como anticoagulante. Se realizó el conteo total de leucocitos haciendo una dilución 1:20 de la sangre con reactivo de Turk, después se colocó la muestra en la cámara de Neubauer (Blau Brand, Alemania) y se realizó el conteo, de acuerdo a la técnica descrita por Coles (1989). Para el conteo diferencial se elaboraron frotis en un portaobjetos colocando 20 μL de sangre con anticoagulante, el frotis se secó y fijó con etanol al 96% y se tiñó con hemocolorante rápido. Se realizó la observación en un microscopio óptico, con objetivo de inmersión, contando un total de 200 células y se realizaron los cálculos pertinentes para

obtener la cantidad de neutrófilos, linfocitos, monocitos y eosinófilos. El resultado de los conteos fue expresado en 1×10^9 células por litro, de acuerdo al Sistema Internacional de Unidades.

Se determinó el volumen del paquete celular mediante la técnica de microhematocrito, para lo cual se centrifugó la sangre en tubos capilares durante 10 minutos a 5000 rpm, posteriormente se utilizó un lector de microhematocrito. Después, del mismo tubo capilar se obtuvo una gota de plasma para medir las proteínas plasmáticas con un refractómetro manual de Golberg, el resultado se expresa en g/dL (Coles, 1989).

5.8. Determinación de subpoblaciones de linfocitos T.

Se utilizaron las muestras de sangre obtenidas por punción yugular en tubos con sistema de vacío con EDTA.

Procedimiento:

Se colocaron 2 μL del anticuerpo monoclonal, anti CD3-FITC/CD4-RPE (R-ficoeritina) canino (Serotec Cat. DC046) y anti CD3-FITC/CD8-RPE canino (Serotec Cat. DC047), en el fondo de tubos de polipropileno de 12×75 mm. Se agregaron 20 μL de sangre y se mezcló suavemente. Se incubó durante 20 min a 4° C en obscuridad. Se añadieron 200 μL de solución de lisis para eritrocitos (Anexo 2), se incubó 10 min a 4° C en obscuridad. Las muestras se centrifugaron a 400×g durante 5 min, se decantó el sobrenadante y se resuspendieron las células con agitación suave. Nuevamente se lavaron 2 veces con 0.5 mL de PBS, centrifugaron, decantaron y resuspendieron las células. Se agregaron 200 μL de PBS-paraformaldehído 1% (PBS-PF) [Brodersen *et al.*, 1998; Otani *et al.*, 2002]. Se conservaron a 4° C en obscuridad hasta el momento de su lectura (al día siguiente) en el citómetro de flujo CyAn ADP (DAKO Colorado Inc, USA). Las muestras se trabajaron por duplicado y se contabilizaron 10,000 células por muestra; el porcentaje de células positivas a CD3 y CD4/CD8 se calculó con la ayuda de los histogramas (Anexo 3) obtenidos con el software Summit v.4.3. La asistencia técnica para el uso del analizador de células fue amablemente facilitado por el personal técnico del área de Citometría de Flujo de los Laboratorios Centrales del CINVESTAV-IPN, Unidad Zacatenco.

5.9. Determinación de anticuerpos.

Se colectó sangre sin anticoagulante para obtener el suero. Los sueros fueron almacenados a -70 °C para su posterior evaluación a través de la técnica de ELISA indirecta.

Procedimiento:

1) Sensibilización de las placas: se utilizaron microplacas de poliestireno, con fondo plano, de 96 pozos (Cat. 3591, Corning Costar, USA). Se empleó como antígeno una suspensión del virus de moquillo canino, cepa Snyder Hill (VR-526 ATCC, USA), cultivado en células MA-104, que contenía 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de proteína; se colocaron 100 μL del antígeno en cada uno de los pozos, se añadieron 100 μL de amortiguador de carbonatos (Carbonato-Bicarbonato 0.1 M, pH 9.5) para lograr la adsorción del antígeno. Se incubó a 37 °C durante 3 h en una cámara húmeda. Transcurrido ese tiempo se decantó el contenido de la placa y se lavó en 2 ocasiones con solución amortiguadora de lavado (PBS pH 7.2-Tween-20, 0.05%) en cantidades de 300 μL por pozo y una vez más con 300 $\mu\text{L}/\text{pozo}$ de agua desionizada. Se colocaron 150 μL por pozo de solución bloqueadora (gretina al 0.25%) y 150 μL por pozo de solución amortiguadora de carbonatos; se incubó nuevamente la placa a 37 °C durante 3 h, en cámara húmeda. Se lavó la placa igual que en el paso anterior. Las placas sensibilizadas de este modo se almacenaron a -20°C hasta su uso.

2) Desarrollo de la ELISA: Cada muestra fue probada por triplicado y se obtuvo un promedio del valor de la absorbancia para realizar los cálculos. Se utilizó una dilución de los sueros de 1:100 en PBS, se colocaron 100 μL por pozo, y se incubó la placa durante 1 h a 37 °C. Se decantó la placa y se lavó 2 veces con solución amortiguadora de lavado (PBS pH 7.2-Tween-20 0.05%) en cantidad de 300 μL por pozo y una vez con 300 $\mu\text{L}/\text{pozo}$ de agua desionizada. Se añadieron 100 $\mu\text{L}/\text{pozo}$ de una suspensión de anticuerpos anti IgG canina, conjugado con peroxidasa (Cat. A9042, Sigma, USA), diluido 1:10,000 en solución amortiguadora de citrato-fosfato 0.05M (pH 5.0) y se incubó durante 1 h a 37 °C. Se procedió a lavar la placa en condiciones idénticas. Para el revelado de la placa, se preparó una solución consistente en 20 mg de ortofenilendiamina (Cat. P9029, Sigma, USA), diluidos en 10 mL de solución amortiguadora de citrato, pH 5.0, más 80 μL de peróxido de hidrógeno; a razón de 100 μL por pozo. Seguidamente, la placa se mantuvo a temperatura

ambiente en un lugar oscuro, por un período de 5 min. La reacción fue detenida por la adición de 50 μL por pozo, de ácido fosfórico al 6 %. La lectura de cada placa se realizó a 492 nm con un lector automático de ELISA (Multiskan Ascent, Labsystems, USA).

Fueron empleados como controles positivos y negativos, sueros probados y proporcionados por el laboratorio comercial Especialidades en Diagnóstico S.A. de C.V. Para evaluar los resultados se promedió la densidad óptica de las repeticiones de cada suero, el punto de corte se determinó con la media aritmética de las muestras negativas más dos desviaciones estándar.

5.10. Examen post-mortem.

A los 33 días postinfección se aplicó la eutanasia utilizando pentobarbital sódico (60 mg/kg IV), se procedió a realizar la necropsia de acuerdo a la técnica descrita por Moreno *et al.* (2006). Se tomaron muestras para histopatología de los siguientes órganos: linfonodo bronquial, pulmón, timo, bazo, estómago, intestino, hígado, riñón, vejiga y SNC (cerebro, cerebelo y médula oblonga); en todos los casos de la misma región anatómica. Los tejidos fueron fijados en una solución de formalina amortiguada al 10%. Posteriormente se procesaron para su inclusión en parafina, se tiñeron con hematoxilina y eosina (H-E) y se revisaron en microscopio óptico. Se realizó el examen histopatológico para determinar la presencia y severidad de las lesiones, clasificándolas como sigue:

Cuadro 4. ESCALA PARA EVALUACIÓN HISTOPATOLÓGICA.

Sin alteración	(-)	0
Leve: trastornos degenerativos, inflamación muy escasa	(+)	1
Moderado, inflamación escasa, necrosis	(++)	2
Severo, inflamación o necrosis abundantes	(+++)	3
Muy severo, inflamación muy abundante con necrosis	(++++)	4

5.11. Aislamiento viral.

Se colectaron durante la necropsia y en condiciones de esterilidad muestras de timo, linfonodos bronquiales, pulmón, cerebelo y médula oblonga, para realizar el aislamiento viral. Los tejidos fueron almacenados a -70°C , después se homogeneizaron los tejidos con PBS a 4°C , en un mortero de vidrio (Pyrex), creando una suspensión al 10% (peso/vol.). Se centrifugó a 1,500 g durante 20 minutos y el sobrenadante se pasó a través de un filtro de membrana de polifluoruro de vinilideno con poros de 0.45μ , este material fue inoculado por duplicado en monocapas de células MA-104, usando placas de cultivo de 24 pozos (Cat. 144530, Nunc, USA) a razón de $100\ \mu\text{L}$ de inóculo por pozo. Se revisaron diariamente hasta ver el efecto citopático. Con la finalidad de confirmar la presencia del virus mediante la prueba de inmunofluorescencia, se infectaron también células cultivadas en portaobjetos divididos en 8 pozos (Lab-Tek, Cat. 155411, Nunc, USA). Se realizó la técnica de inmunofluorescencia directa, tal como se describió anteriormente.

5.12. Análisis estadístico.

La comparación estadística entre los grupos experimentales se realizó con el paquete estadístico Statgraphics plus v.5.0, mediante un análisis de varianza (ANOVA), seguido de la prueba de Diferencia Honesta Significativa de Tukey, tomando en cuenta un valor de significancia del 95% ($P=0.05$) para distinguir la diferencia entre los tratamientos.

6. RESULTADOS

6.1. Evaluación clínica.

Los animales de los Grupos A y B no inoculados, no presentaron ninguna signología durante el periodo de observación. Los cachorros de los Grupos C, D y E, que fueron inoculados con CDV, presentaron signología clínica compatible con esta enfermedad, comenzando a los 2 días postinfección y que consistió en: fiebre, secreción nasal y ocular, conjuntivitis, uveítis con opacidad corneal (ver Figura 21), diarrea mucosa, signos nerviosos (mioclonus). En el Cuadro 5 se resume la presencia de signología por grupo, en todos los casos, la signología fue clasificada como leve, sin embargo la frecuencia de presentación fue distinta, ya que los signos persistieron por varios días en algunos individuos, resultando así el total por grupo.

Cuadro 5. SIGNOLOGÍA CLÍNICA EN CACHORROS INOCULADOS EXPERIMENTALMENTE CON CDV. **GRUPO C** INOCULADO Y SIN TRATAMIENTO, **GRUPO D** INOCULADO Y CON TRATAMIENTO FT_e, **GRUPO E** INOCULADO Y CON TRATAMIENTO FT_{ne}. NO SE PRESENTAN DATOS DE GRUPOS A Y B DEBIDO A QUE NO SE OBSERVARON SIGNOS CLÍNICOS.

	Número de animales enfermos en cada grupo					
	Grupo C	Valor	Grupo D	Valor	Grupo E	Valor
Fiebre	3	8	4	15	3	10
Secreción ocular	1	1	2	2	1	1
Conjuntivitis	0		1	1	1	3
Uveítis	0		1	4	1	5
Descarga nasal	1	1	1	1	0	
Diarrea	1	2	2	1	1	1
Mioclonus	0		1	3	0	
Valor total según escala		12		27		20

En la Figura 3 se presenta una gráfica que muestra de manera apilada los signos compatibles con enfermedad de moquillo canino posterior a la inoculación. En esta gráfica se puede observar que la mayor variedad y frecuencia de signos clínicos se presentó entre los días 18 y 20 posteriores a la infección. También se puede notar que la fiebre persistió en algunos individuos hasta los 31 días.

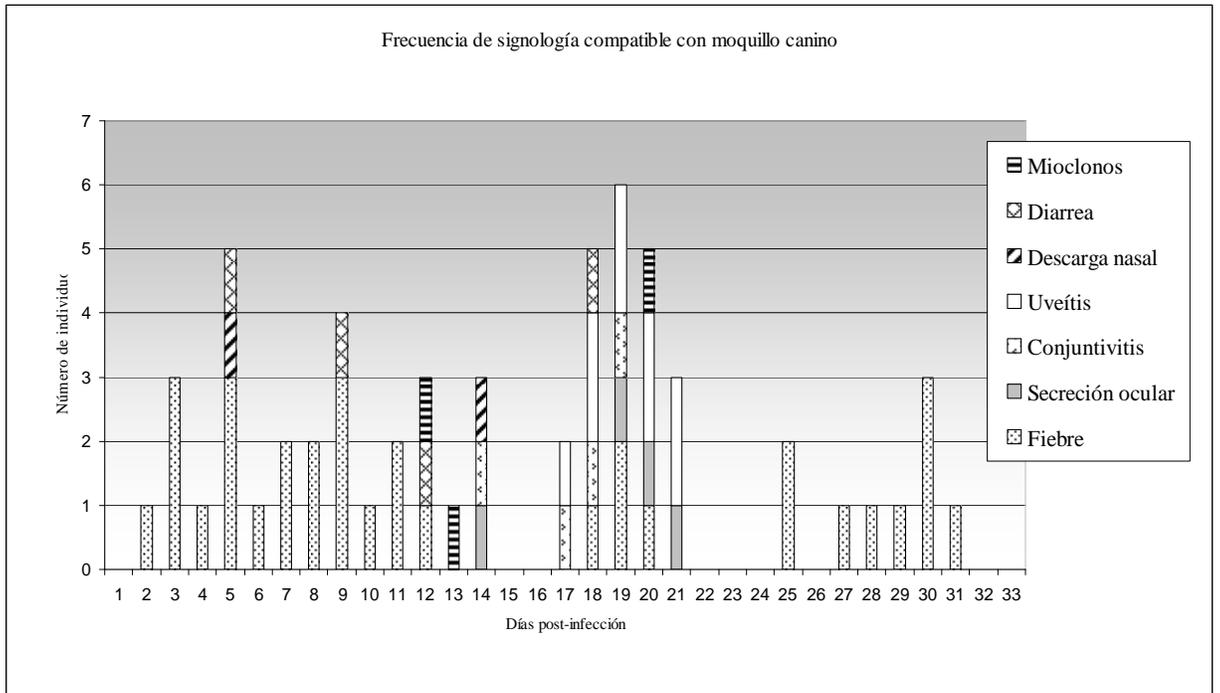


Figura 3. FRECUENCIA DE SIGNOLOGÍA CLÍNICA POR DÍA. INCLUYE DATOS DE LOS GRUPOS C, D y E. EL TRATAMIENTO SE APLICÓ LOS DÍAS 10, 11, 12, 13, 15, 17, 19 Y 25.

La temperatura rectal fue considerada como fiebre cuando estuvo arriba de 39.5°C. Comenzó a registrarse la fiebre a los 2 días postinfección, llegó hasta 41.1°C en un individuo del grupo D, en el cual se mantuvo elevada por 7 días; sin embargo, al realizar el cálculo del promedio por grupo, este valor no fue evidente. En la Figura 4 se presenta una gráfica de la temperatura promedio por grupo, obtenida diariamente, se puede observar la presencia de fiebre entre los días 2 y 12 después de la infección, luego a los 18-20 y entre los 25 y 31 días. No se encontró diferencia significativa ($P < 0.05$) al comparar las medias por grupo.

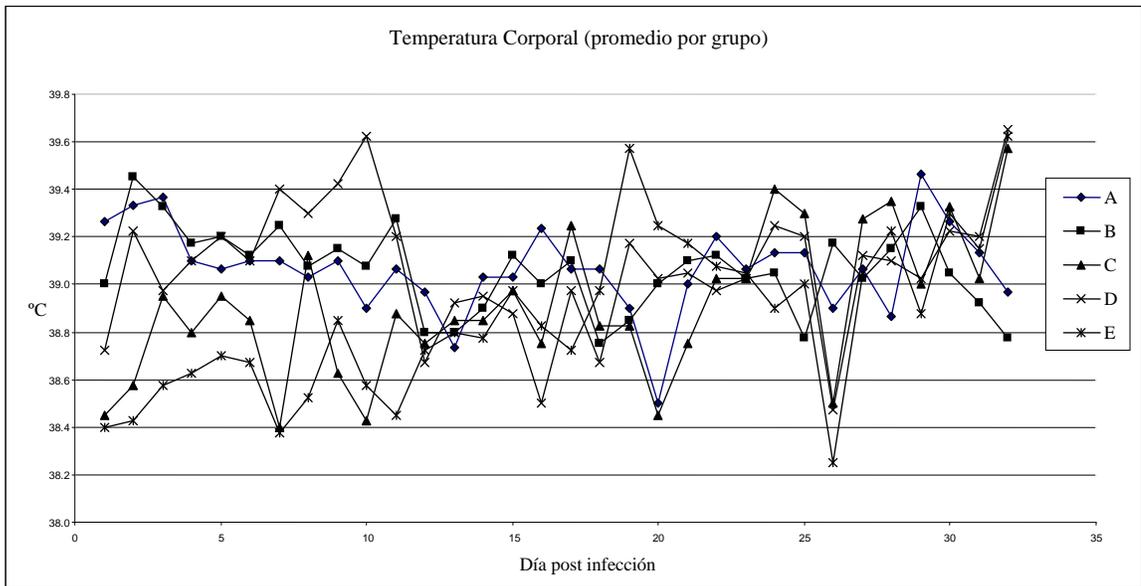


Figura 4. TEMPERATURA RECTAL DE CACHORROS CON INFECCIÓN EXPERIMENTAL POR CDV. **GRUPO A** CONTROL, **GRUPO B** CON TRATAMIENTO FTe, **GRUPO C** INOCULADO Y SIN TRATAMIENTO, **GRUPO D** INOCULADO Y CON TRATAMIENTO FTe, **GRUPO E** INOCULADO Y CON TRATAMIENTO FTne. NO SE OBSERVÓ DIFERENCIA ESTADÍSTICA SIGNIFICATIVA ($P < 0.05$).

6.2. Inmunofluorescencia directa (IFD).

Los animales de los Grupos A y B fueron todos negativos a la prueba de IFD, en los Grupos C, D y E se obtuvieron resultados positivos en 9 de 12 individuos; todos con resultado 1+ en una escala de 1+ a 4+. En la Figura 5 se muestran estos datos de manera esquemática.

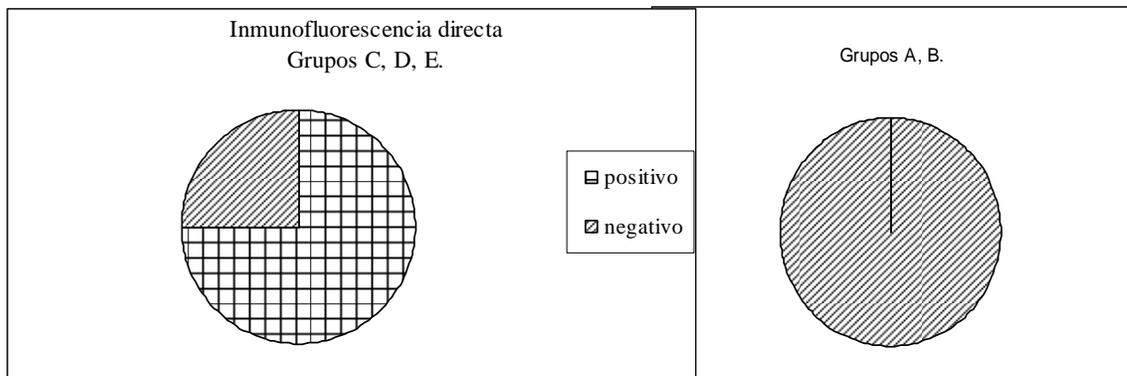


Figura 5. RESULTADO DE LA PRUEBA DE INMUNOFLUORESCENCIA DIRECTA.

6.3. Biometría hemática (BH).

En la Figura 6 se graficaron los promedios por grupo para cada día de muestreo, el conteo total de leucocitos mostró elevación, arriba de 15.0×10^9 leucocitos/L los días 5, 10, 25 y 32 en los Grupos C, D y E (los tres inoculados con CDV). Sin embargo, sólo se observó diferencia estadística ($P < 0.05$) los días 10 y 32.

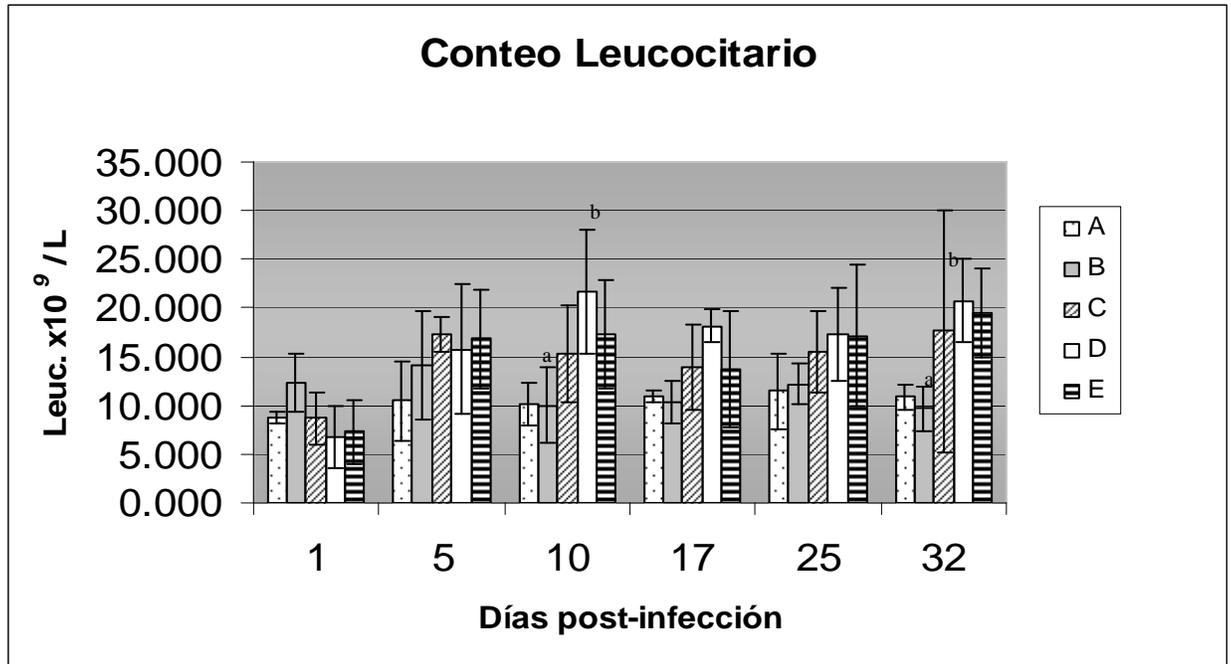


Figura 6. CONTEO TOTAL DE LEUCOCITOS. GRUPO A CONTROL, GRUPO B CON TRATAMIENTO FTE, GRUPO C INOCULADO Y SIN TRATAMIENTO, GRUPO D INOCULADO Y CON TRATAMIENTO FTE, GRUPO E INOCULADO Y CON TRATAMIENTO FTNE. LITERAL DIFERENTE INDICA DIFERENCIA ESTADÍSTICA ($P < 0.05$).

En las Figuras de la 7 a la 11 se muestra el resultado del conteo diferencial de los diferentes tipos de leucocitos realizado en frotis sanguíneos. Los valores mostrados son promedios por grupo y por día de muestreo.

En la Figura 7 se muestran los valores correspondientes para neutrófilos, que se elevaron en los cinco grupos experimentales, y aunque se mantuvieron en niveles más altos en los Grupos infectados (C, D y E), no se encontró diferencia estadística.

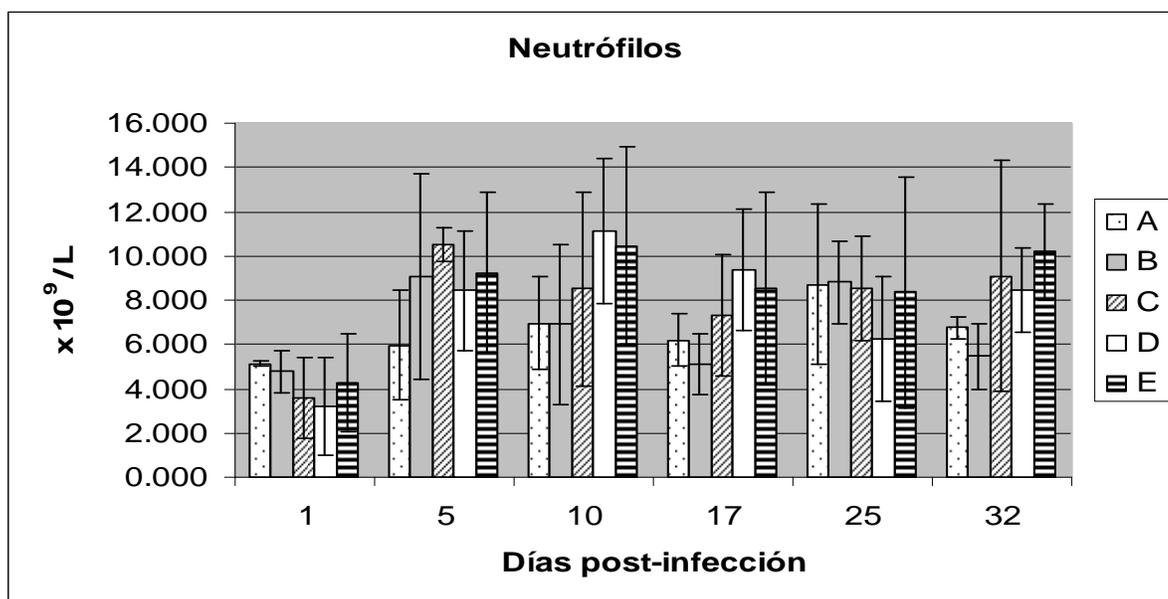


Figura 7. CANTIDAD DE NEUTRÓFILOS. **GRUPO A** CONTROL, **GRUPO B** CON TRATAMIENTO FTe, **GRUPO C** INOCULADO Y SIN TRATAMIENTO, **GRUPO D** INOCULADO Y CON TRATAMIENTO FTe, **GRUPO E** INOCULADO Y CON TRATAMIENTO FTne. NO SE OBSERVÓ DIFERENCIA ESTADÍSTICA SIGNIFICATIVA ($P < 0.05$).

La Figura 8 representa los valores promedio de los linfocitos, se puede observar que el número de linfocitos en los frotis se incrementó en los Grupos infectados con CDV (C, D y E) a partir del día 5 post-infección, se mantuvo elevado y se observó diferencia ($P < 0.05$) los días 10, 25 y 32 con respecto a los Grupos no infectados (A y B).

El tratamiento con FT en animales no infectados (Grupo B) no mostró elevación en la cantidad de linfocitos sanguíneos, esto se observa claramente en la gráfica de la Figura 9.

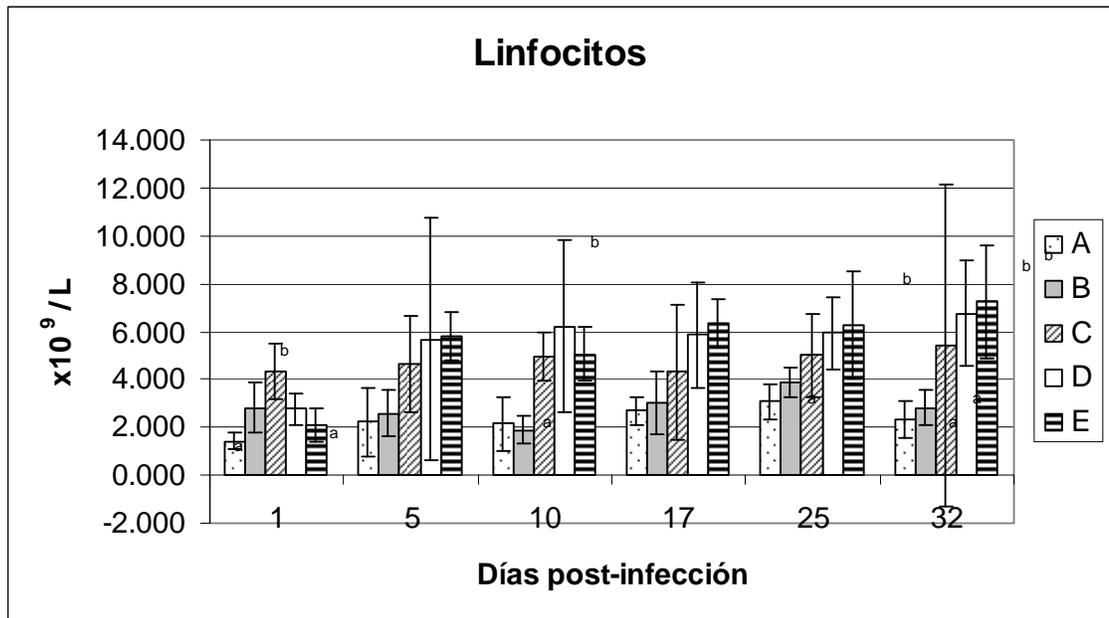


Figura 8. CANTIDAD DE LINFOCITOS. **GRUPO A** CONTROL, **GRUPO B** CON TRATAMIENTO FTe, **GRUPO C** INOCULADO Y SIN TRATAMIENTO, **GRUPO D** INOCULADO Y CON TRATAMIENTO FTe, **GRUPO E** INOCULADO Y CON TRATAMIENTO FTne. LITERAL DIFERENTE INDICA DIFERENCIA ESTADÍSTICA ($P < 0.05$).

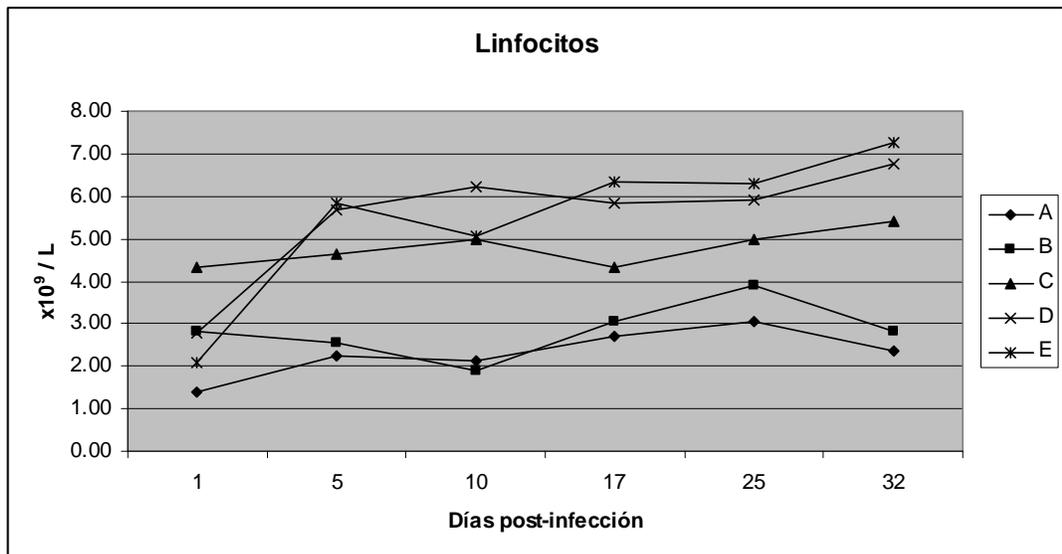


Figura 9. CANTIDAD DE LINFOCITOS. **GRUPO A** CONTROL, **GRUPO B** CON TRATAMIENTO FTe, **GRUPO C** INOCULADO Y SIN TRATAMIENTO, **GRUPO D** INOCULADO Y CON TRATAMIENTO FTe, **GRUPO E** INOCULADO Y CON TRATAMIENTO FTne. NÓTESE QUE EN LOS GRUPOS A Y B, NO INFECTADOS, NO HUBO ELEVACIÓN.

La Figura 10 muestra la cantidad de monocitos, que aumentó los días 10 y 17 en el Grupo D, con infección por CDV y tratado con FTe, aunque no mostró diferencia estadísticamente significativa en relación a los otros tratamientos. Para el día 25 volvió a los niveles basales y se mantuvo así hasta el final del experimento.

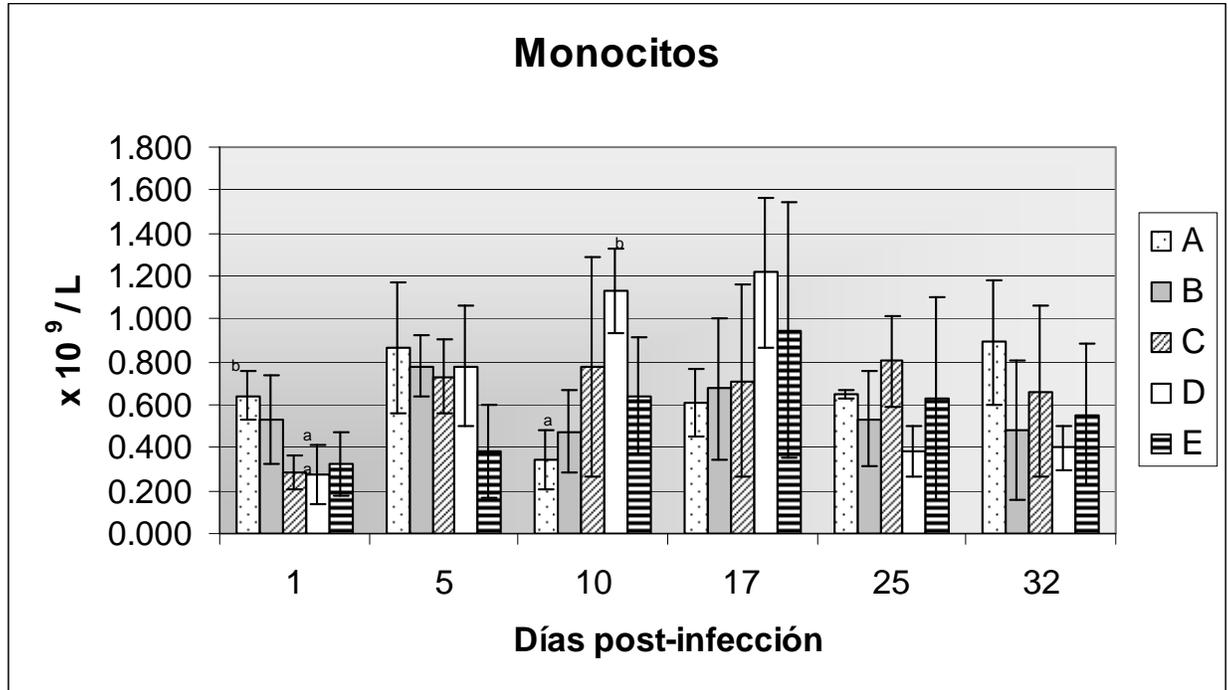


Figura 10. CANTIDAD DE MONOCITOS EN SANGRE. **GRUPO A** CONTROL, **GRUPO B** CON TRATAMIENTO FTe, **GRUPO C** INOCULADO Y SIN TRATAMIENTO, **GRUPO D** INOCULADO Y CON TRATAMIENTO FTe, **GRUPO E** INOCULADO Y CON TRATAMIENTO FTne. LITERAL DIFERENTE INDICA DIFERENCIA ESTADÍSTICA (P< 0.05).

En la Figura 11 se graficaron los valores para eosinófilos sanguíneos, este tipo celular presentó variación en todo el curso del experimento, todos los grupos presentaron elevación en algunas de las muestras tomadas pero sin mostrar diferencias entre ellos.

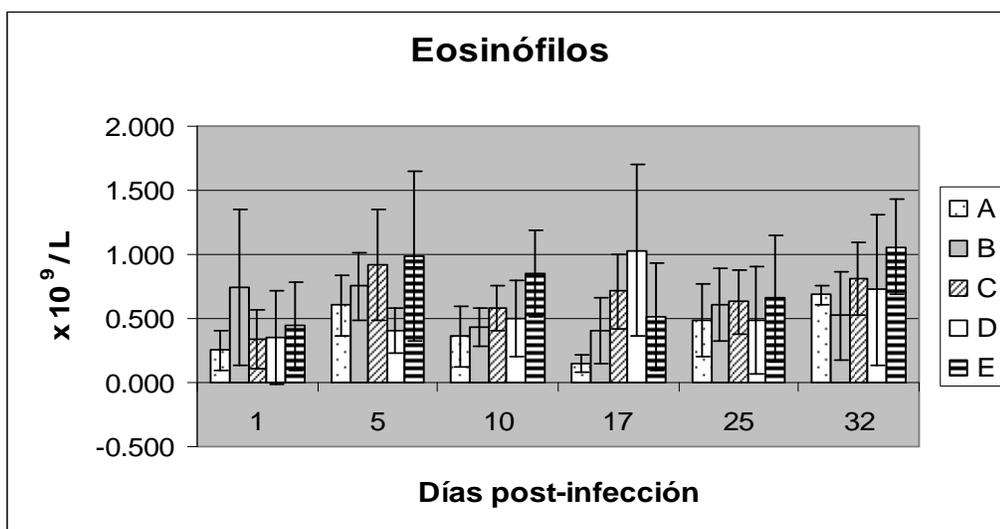


Figura 11. CANTIDAD DE EOSINÓFILOS. **GRUPO A** CONTROL, **GRUPO B** CON TRATAMIENTO FTe, **GRUPO C** INOCULADO Y SIN TRATAMIENTO, **GRUPO D** INOCULADO Y CON TRATAMIENTO FTe, **GRUPO E** INOCULADO Y CON TRATAMIENTO FTne. NO SE OBSERVÓ DIFERENCIA ESTADÍSTICA SIGNIFICATIVA ($P < 0.05$).

La Figura 12 muestra los valores promedio del hematocrito por grupo, expresado en porcentaje. La proporción del hematocrito se vió incrementada el día 25 en los Grupos infectados (C, D y E) con relación a los Grupos no infectados (A y B).

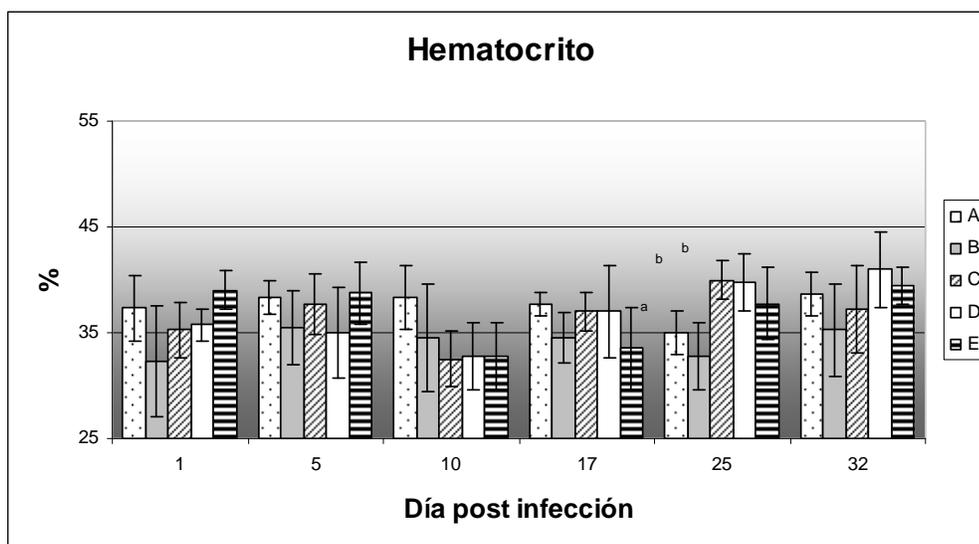


Figura 12. HEMATOCRITO. **GRUPO A** CONTROL, **GRUPO B** CON TRATAMIENTO FTe, **GRUPO C** INOCULADO Y SIN TRATAMIENTO, **GRUPO D** INOCULADO Y CON TRATAMIENTO FTe, **GRUPO E** INOCULADO Y CON TRATAMIENTO FTne. LITERAL DIFERENTE INDICA DIFERENCIA ESTADÍSTICA ($P < 0.05$).

En la Figura 13 se representan los resultados obtenidos para la determinación de proteínas plasmáticas. A lo largo del experimento, no hubo diferencia en los valores de proteínas plasmáticas entre los grupos.

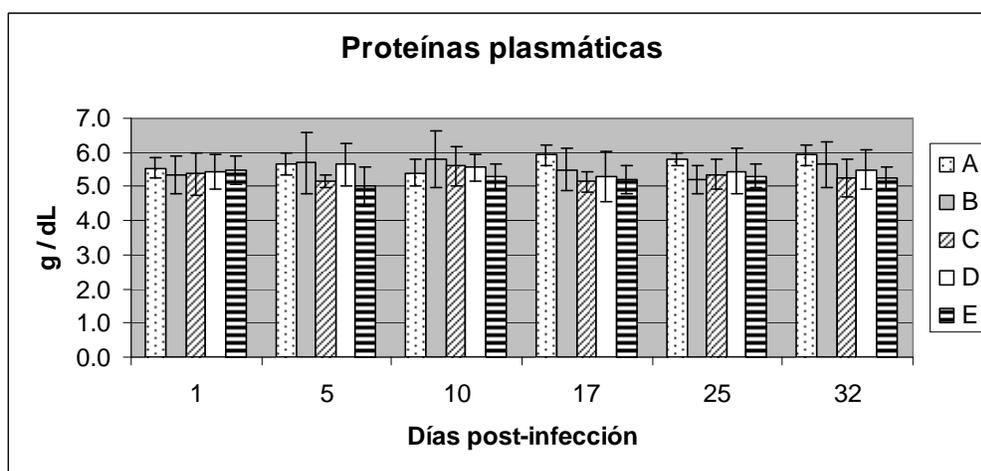


Figura 13. PROTEÍNAS PLASMÁTICAS. **GRUPO A** CONTROL, **GRUPO B** CON TRATAMIENTO FTe, **GRUPO C** INOCULADO Y SIN TRATAMIENTO, **GRUPO D** INOCULADO Y CON TRATAMIENTO FTe, **GRUPO E** INOCULADO Y CON TRATAMIENTO FTne. NO SE OBSERVÓ DIFERENCIA ESTADÍSTICA SIGNIFICATIVA ($P < 0.05$).

6.4. Determinación de subpoblaciones de linfocitos T.

La Figura 14 muestra los promedios de los porcentajes de células linfoides que expresan CD4, la cantidad de este tipo de linfocitos se mantuvo entre 8 y 17 % en todos los grupos durante el tiempo del experimento, no se observaron diferencias estadísticas.

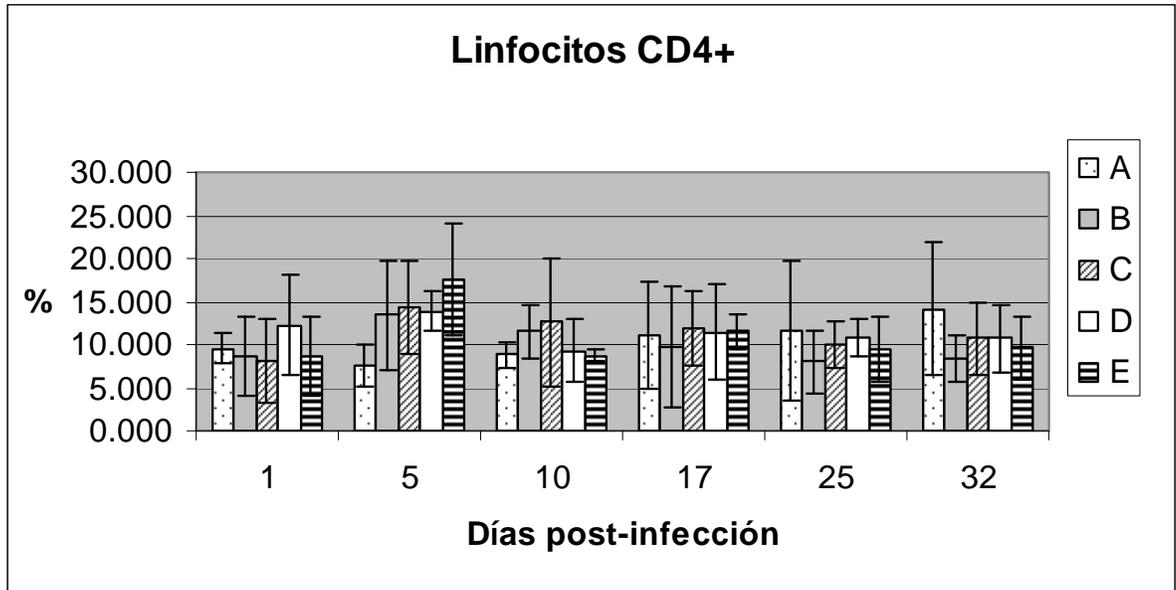


Figura 14. PORCENTAJE DE LINFOCITOS CD4+. **GRUPO A** CONTROL, **GRUPO B** CON TRATAMIENTO FT_e, **GRUPO C** INOCULADO Y SIN TRATAMIENTO, **GRUPO D** INOCULADO Y CON TRATAMIENTO FT_e, **GRUPO E** INOCULADO Y CON TRATAMIENTO FT_{ne}. NO SE OBSERVÓ DIFERENCIA ESTADÍSTICA SIGNIFICATIVA (P< 0.05).

En la Figura 15 se puede apreciar que la cantidad de linfocitos que expresaban CD8 se incrementó en los grupos infectados a partir del día 5 PI, disminuyendo nuevamente para el día 10 y 17, para luego volver a incrementarse el día 25, en los dos Grupos infectados y tratados con FT (D y E); se observa diferencia estadísticamente significativa el día 32. El Grupo B, que fue tratado con FT_e, pero no infectado con CDV no mostró variación en el porcentaje de este subtipo celular.

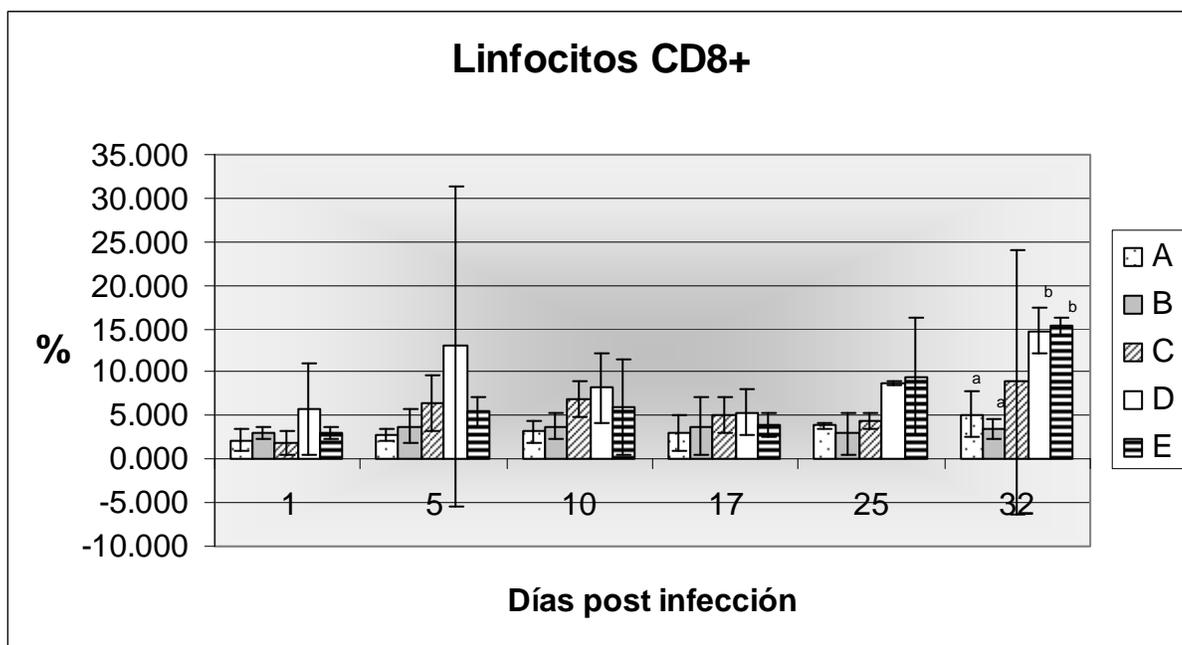


Figura 15. PORCENTAJE DE LINFOCITOS CD8+. **GRUPO A** CONTROL, **GRUPO B** CON TRATAMIENTO FTe, **GRUPO C** INOCULADO Y SIN TRATAMIENTO, **GRUPO D** INOCULADO Y CON TRATAMIENTO FTe, **GRUPO E** INOCULADO Y CON TRATAMIENTO FTne. LITERAL DIFERENTE INDICA DIFERENCIA ESTADÍSTICA ($P < 0.05$).

6.5. Determinación de anticuerpos anti CDV.

Se probaron por triplicado 10 sueros negativos, se calculó el promedio y la desviación estándar de las absorbancias y se estableció el punto de corte aumentando dos desviaciones estándar a la media, este resultó en 0.298. Los sueros de cada muestreo fueron analizados por triplicado y se obtuvo el promedio de la densidad óptica, estos resultados se presentan de manera gráfica en las Figuras 16 y 17; los resultados por abajo del punto de corte se consideraron negativos. Los animales de los grupos que no fueron inoculados permanecieron negativos durante todo el experimento. Los tres grupos inoculados con CDV mostraron elevación en la densidad óptica, que representa la cantidad de anticuerpos de tipo IgG contra el virus de moquillo canino.

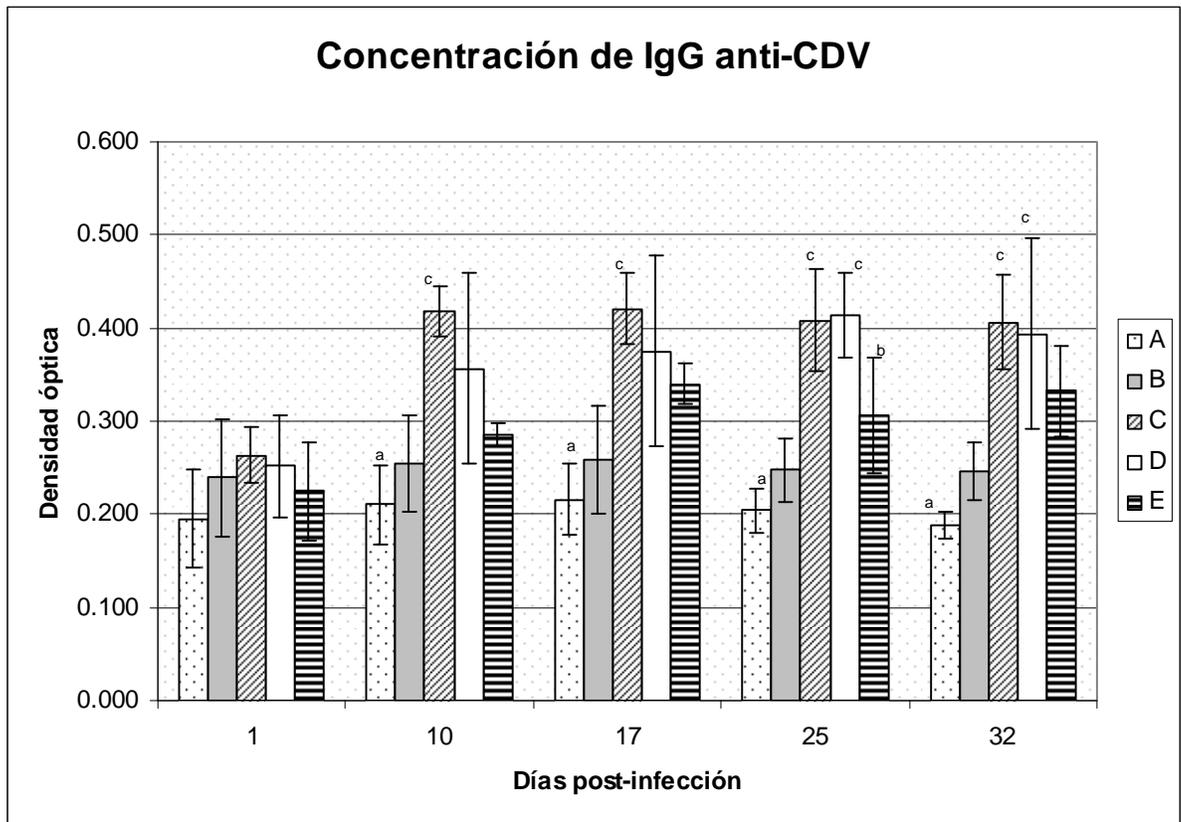


Figura 16. CONCENTRACIÓN DE IgG ANTI-CDV EXPRESADO EN DENSIDAD ÓPTICA. **GRUPO A** CONTROL, **GRUPO B** CON TRATAMIENTO FTe, **GRUPO C** INOCULADO Y SIN TRATAMIENTO, **GRUPO D** INOCULADO Y CON TRATAMIENTO FTe, **GRUPO E** INOCULADO Y CON TRATAMIENTO FTne. LITERALES DIFERENTES EXPRESAN DIFERENCIA ESTADÍSTICA SIGNIFICATIVA POR DÍA, EN PRUEBA DE TUKEY ($P < 0.05$). **LOS VALORES POR DEBAJO DE 0.298 SE CONSIDERAN NEGATIVOS.**

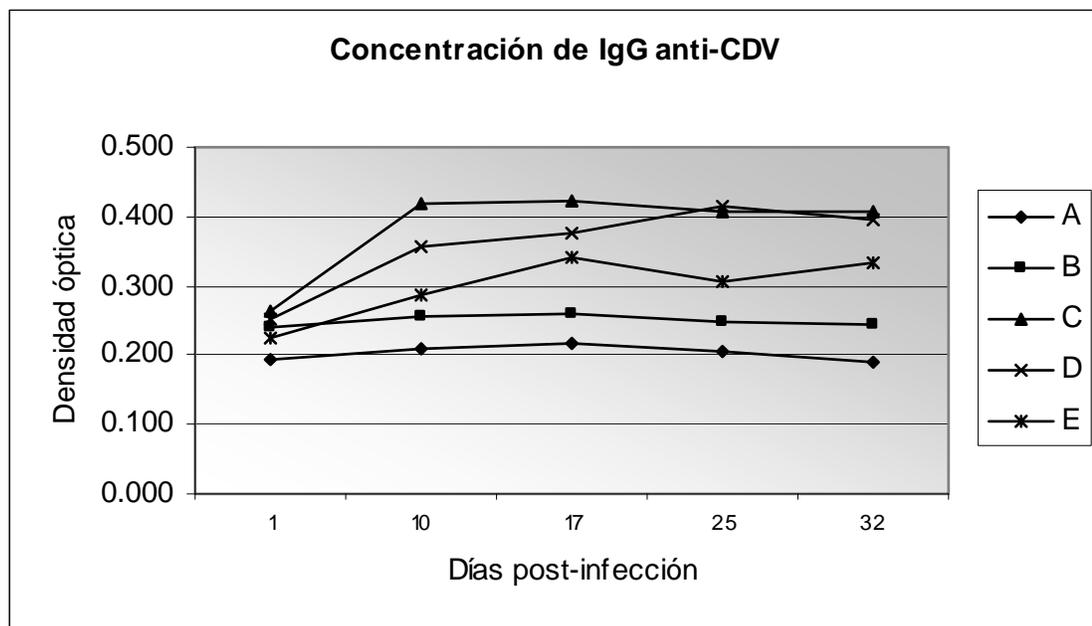


Figura 17. CONCENTRACIÓN DE IgG ANTI-CDV EXPRESADO EN DENSIDAD ÓPTICA. **GRUPO A** CONTROL, **GRUPO B** CON TRATAMIENTO FTe, **GRUPO C** INOCULADO Y SIN TRATAMIENTO, **GRUPO D** INOCULADO Y CON TRATAMIENTO FTe, **GRUPO E** INOCULADO Y CON TRATAMIENTO FTne. **LOS VALORES POR DEBAJO DE 0.298 SE CONSIDERAN NEGATIVOS.**

6.6. Examen post-mortem.

Durante la necropsia se encontraron lesiones compatibles con infección por CDV en los animales de los grupos infectados, las cuales consistieron en neumonía intersticial leve y enteritis mucosa leve, principalmente en intestino delgado. Los animales de los Grupos A y B, no infectados, no presentaron cambios patológicos en el examen macroscópico.

En todos los grupos, incluidos los no infectados, se observaron alteraciones microscópicas. Las lesiones encontradas en todos los casos fueron de leves a moderadas; en el pulmón se observó neumonía intersticial; en bazo linfocitosis; en timo linfocitosis y atrofia de la corteza; en linfonodo bronquial linfocitosis; en hígado degeneración vacuolar, infiltrado linfocitario y degeneración albuminosa; en intestino delgado enteritis eosinofílica, enteritis linfocítica, hiperplasia linfocítica y linfocitosis; en estómago hiperplasia linfocítica; en riñón nefritis linfocítica intersticial; en SNC degeneración y necrosis neuronal, cuerpos de

inclusión IN. En el Cuadro 6 se muestran los resultados de acuerdo a la escala propuesta en la sección de material y métodos.

Cuadro 6. HALLAZGOS HISTOLÓGICOS EN CACHORROS INOCULADOS Y NO INOCULADOS EXPERIMENTALMENTE CON CDV. 0 = sin lesión, 1 = leve, 2 = moderado, 3 = severo, 4 = muy severo.

Perro Grupo/ número	Órgano											Total por grupo
	Pulmón	Linfonodo	Timo	Bazo	Hígado	Estómago	Intestino	Riñón	Vejiga	SNC	Total	
A1	1	0	0	0	1	0	2	0	0	0	4	Grupo A
A2	3	0	0	0	0	0	1	0	0	0	4	
A3	2	0	0	0	0	0	3	0	0	0	5	
A4	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	
B1	1	0	0	0	1	0	2	0	0	0	4	Grupo B
B2	2	0	0	0	1	0	2	0	0	1	6	
B3	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	3	
B4	1	0	0	1	0	0	2	2	0	0	6	
C1	1	1	2	1	1	1	2	2	0	1	12	Grupo C
C2	1	1	0	0	1	0	2	0	0	2	7	
C3	3	2	1	1	1	0	3	0	0	2	13	
C4	2	1	3	1	1	0	2	1	0	1	12	
D1	2	3	1	1	2	0	2	0	0	1	12	Grupo D
D2	1	0	1	1	0	0	1	1	0	1	6	
D3	1	3	1	2	1	0	0	1	0	2	11	
D4	2	0	0	0	0	0	0	0	0	1	3	
E1	1	0	0	0	0	0	3	0	0	0	4	Grupo E
E2	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	2	
E3	1	0	0	0	1	0	2	0	0	0	4	
E4	1	0	0	2	1	0	2	0	0	0	6	

En las Figuras 18 y 19 se presentan de manera gráfica los resultados de las lesiones histológica observadas, de acuerdo a un valor en una escala arbitraria.

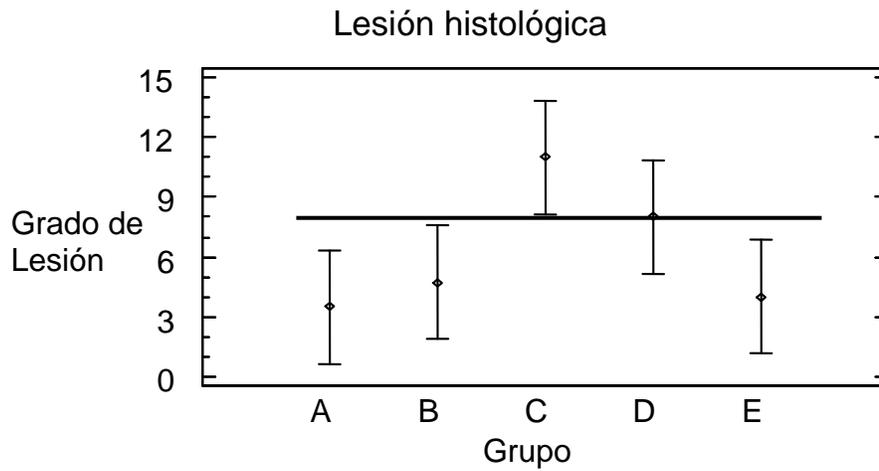


Figura 18. COMPARACIÓN DE MEDIAS DE LAS LESIONES HISTOLÓGICAS. **GRUPO A** CONTROL, **GRUPO B** CON TRATAMIENTO FT_e, **GRUPO C** INOCULADO Y SIN TRATAMIENTO, **GRUPO D** INOCULADO Y CON TRATAMIENTO FT_e, **GRUPO E** INOCULADO Y CON TRATAMIENTO FT_{ne}.

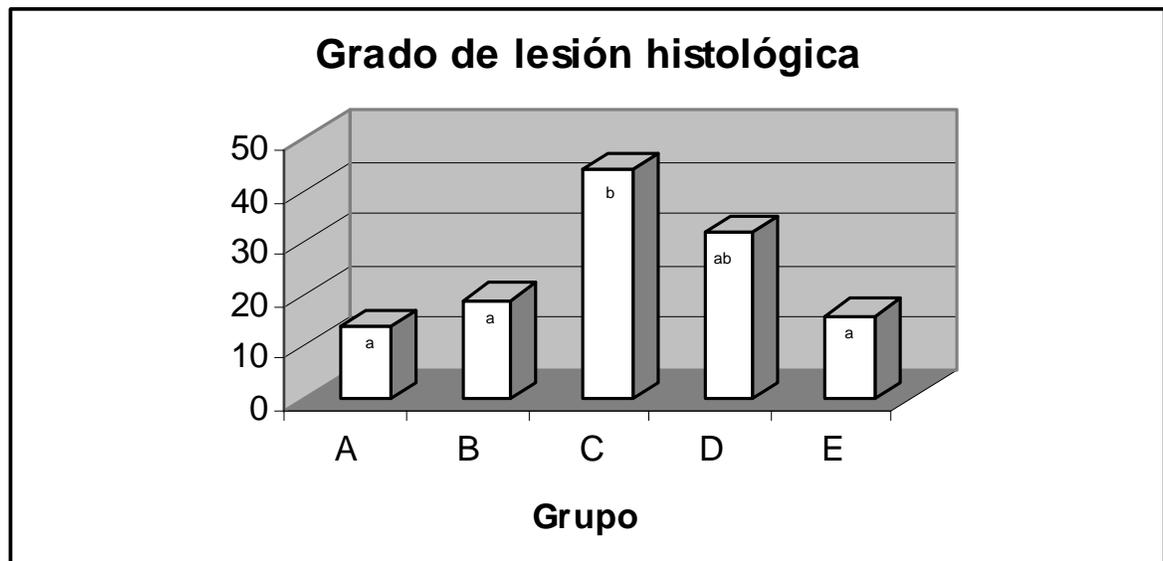


Figura 19. GRADO DE LESIÓN HISTOLÓGICA. **GRUPO A** CONTROL, **GRUPO B** CON TRATAMIENTO FT_e, **GRUPO C** INOCULADO Y SIN TRATAMIENTO, **GRUPO D** INOCULADO Y CON TRATAMIENTO FT_e, **GRUPO E** INOCULADO Y CON TRATAMIENTO FT_{ne}. LITERALES DIFERENTES EXPRESAN DIFERENCIA ESTADÍSTICA SIGNIFICATIVA, PRUEBA DHST (P < 0.05).

6.7. Aislamiento viral.

Todos los cultivos de los individuos infectados (Grupos C, D y E) mostraron ECP característico, consistente en redondeamiento y vacuolización celular, formación de sincitios de 3 a 5 células y finalmente lisis celular a los 2-3 días post-infección (ver Figura 22), y fueron positivos en la prueba de IFD; los cultivos de los grupos A y B no mostraron ECP y en la IFD dieron resultados negativos.

7. DISCUSIÓN

Evaluación clínica.

Como se puede observar en la Figura 3, los signos clínicos observados en la fase inicial de la infección entre 5 y 9 días PI fueron fiebre, diarrea, descarga nasal; posteriormente entre los días 17 y 21 se observó además secreción ocular, conjuntivitis, uveítis y signología nerviosa.

En la práctica veterinaria el diagnóstico clínico de la enfermedad suele ser difícil ya que la signología puede ser poco clara, lo que da como resultado diagnósticos erróneos. Los signos clínicos observados en los animales inoculados con CDV en este trabajo, son compatibles con la enfermedad de moquillo canino inducido experimentalmente, como lo describen autores como Appel (1982), Iwatsuki (1995), Krakowka (1979) Koutinas (2002) y Schobesberger *et al.* (2005). Sin embargo, es importante mencionar que la presentación y duración de los signos clínicos pueden variar, dependiendo de la respuesta del individuo (Kim *et al.*, 2006), así como del título de anticuerpos maternos y la capacidad de algunos individuos de producir anticuerpos rápidamente después de la infección (Appel, 1970; Krakowka, 1989). Respecto a la presentación intermitente de la fiebre, también ha sido descrita por otros investigadores (Appel, 1969; Greene y Appel 2000; Schobesberger *et al.*, 2005), que mencionan una elevación de la temperatura corporal mayor a 39°C entre los 3 y 5 días y un segundo pico a los 14 ó 15 días postinfección, nosotros observamos elevación de la temperatura entre los 5 y 9 días, luego a los 20 post infección y un tercer pico entre los 25 y 30 días. Es posible que la presencia de mayor signología clínica en los grupos tratados con FT (Grupos D y E) se deba al aumento en la producción de citocinas proinflamatorias, como IFN y TNF (Ojeda *et al.*, 2005; Luna *et al.*, 2006). Sería recomendable en estudios posteriores evaluar la liberación de citocinas en individuos tratados con FT.

Inmunofluorescencia directa (IFD) .

A pesar de existir diferentes herramientas de diagnóstico tales como la determinación del número de leucocitos y prueba de ELISA entre otras, se seleccionó la de

inmunofluorescencia directa, ya que esta herramienta de diagnóstico muestra de manera directa la presencia del antígeno, el cual puede ser detectado en diversos órganos o tejidos, como son las células linfoides, tejido pulmonar, estómago, intestino, epitelio de vejiga urinaria, así como en epitelio conjuntival, este último tejido se seleccionó por su accesibilidad (Coles, 1989; Greene y Appel, 2000). Greene y Appel (2000) señalan que el antígeno puede ser localizado mediante esta técnica en los leucocitos de la sangre periférica y en las células de la conjuntiva o en la mucosa respiratoria y genital, desde los 2 a 5 días postinfección. Pero a medida que aumenta el título de anticuerpos, alrededor de los 9 días disminuye la cantidad de virus, a menos que el individuo no desarrolle una respuesta inmunitaria suficiente; asimismo afirma que durante las 3 primeras semanas postinfección es posible detectar el CDV en la conjuntiva mediante IF. Appel (1969) observó reacción positiva a IF en epitelio conjuntival en 9 de 9 perros inoculados con CDV a los 7-9 días PI, pero sólo en 8 de 10 a los 14 días PI. Por otro lado, Schobesberger *et al.* (2005) describieron la presencia de signología clínica en más del 50% de los casos de un grupo de perros que fueron inoculados con CDV, en los cuales, sin embargo, no demostraron el antígeno por inmunohistoquímica en el estudio postmortem. En el presente trabajo el antígeno viral pudo ser identificado mediante inmunofluorescencia de mucosa conjuntival, en 9 de los 12 casos en que los perros fueron inoculados con el CDV.

Biometría hemática (BH).

La alteración en la cantidad de leucocitos sanguíneos no se vió afectada manteniéndose constante y dentro de los parámetros reportados como normales (Coles, 1989) en los grupos que no recibieron al virus. En los grupos con infección, a pesar de que algunos individuos mostraron leucopenia durante el transcurso del experimento, al realizar el cálculo de los promedios no se encontraron diferencias significativas, por lo que se observó un incremento en la cantidad de leucocitos circulantes (más de $15 \times 10^9/L$) los días 5, 10, 25 y 32 PI en los Grupos C, D y E, estos datos difieren de lo encontrado en la literatura ya que Schobesberger *et al.* (2005) refieren leucopenia postinfección en los días 6 y 17 a 24 (aunque también reportan leucocitosis debida a granulocitosis el día 3); otros autores (Krakowka, 1979; Axthelm y Krakowka, 1987) han informado leucopenia por linfopenia a

partir de los 5 días PI. La diferencia de los resultados presentados aquí con lo comunicado por otros autores puede deberse a que los cachorros utilizados tenían títulos bajos pero no estaban libres de anticuerpos maternos contra el CDV, lo que le dio oportunidad a la inmunidad adaptativa de responder a la presencia de partículas virales de manera rápida (Appel, 1970; Greene y Appel, 2000; Appel y Summers, 1999). Respecto a los Grupos D y E, infectados y tratados con el factor de transferencia, estos incrementaron la cantidad de leucocitos circulantes, como era de esperarse ya que el factor de transferencia (específico o inespecífico) favorece la síntesis de la interleucina 1 y modula la expresión de otras citocinas, incrementa la actividad de los macrófagos, promueve la síntesis de factores quimiotácticos hacia monocitos y neutrófilos. Y aunque las células más sensibles son los linfocitos T, pudo haber tenido un efecto también sobre otros tipos de leucocitos (Vacek *et al.*, 1997; Fabre *et al.*, 2004; Franco *et al.*, 2004). A pesar de que se observó un incremento en el número total de leucocitos en los grupos con infección y tratados con FT, no se encontró diferencia estadística entre los grupos infectados hasta los 35 días postinfección (Figura 6), lo que haría importante el recomendar ampliar el periodo de evaluación, ya que existen informes en donde los animales con moquillo canino manifiestan de manera patente la leucopenia después de los 30 días postinfección “fase tardía de la enfermedad” (Appel, 1999).

En este trabajo se pudo observar un incremento en la cantidad de neutrófilos en los grupos infectados con o sin tratamiento, no obstante, esto es evidente hasta el día 10 PI, para posteriormente descender e incrementarse el número de linfocitos. Es importante recordar que la primera barrera de defensa inespecífica son los neutrófilos, ya que son los más abundantes en la sangre y los que tienen mayor sensibilidad a la actividad quimiotáctica (Abbas y Lichtman, 2004), por lo que era de esperarse (como sucedió en este trabajo) encontrarlos en mayor cantidad los primeros 10 días postinfección, es decir, antes de iniciar el tratamiento con FT. Hay otros autores que mencionan que el incremento en la cantidad de neutrófilos circulantes en la sangre la primera semana postinfección, es debido a un aumento en la cantidad de infecciones bacterianas saprófitas y patógenas, que aprovechan la inmunodepresión inicial (Chvala *et al.*, 2007).

En este trabajo el mayor incremento en la cantidad de linfocitos circulantes se observa al estar presente el virus inoculado desde los primeros 5 días. Sin embargo, a partir del día 10 PI el incremento es todavía mayor y para el día 32 se observa una clara diferencia; esto puede atribuirse al uso del FT. En el Grupo B (no infectado pero con FT) se observó un incremento posterior al tratamiento, pero volvió a descender en pocos días. Esto concuerda con lo descrito por diversos investigadores (Mateos *et al.*, 1992; Estrada *et al.*, 1998; Ojeda *et al.*, 2005; Berrón *et al.*, 2007) quienes encontraron un aumento de los linfocitos y de las citocinas que los estimulan como el IFN-gamma, IL-2 e IL-4; otros investigadores (Estrada, 1995; Kikpatrick, 2000) mencionan que el FT estimula la unión con el MHC-II y actúa como mitógeno sobre las células del sistema inmune, por lo que se incrementa el número de linfocitos circulantes, similar a lo observado en este trabajo. Sabemos que es importante que las células del sistema mononuclear fagocítico procesen el antígeno para posteriormente efectuar la presentación por MHC I y II a los linfocitos CD8 y CD4, respectivamente, y sintetizar citocinas que estimulen la activación y diferenciación de los linfocitos T (Abbas y Lichtman, 2004; Male *et al.*, 2007).

Al evaluar el hematocrito en los distintos grupos y tiempos, éste sólo mostró diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.05$), al día 25 postinoculación, a pesar de mantenerse dentro del rango del porcentaje de hematocrito señalado para los perros sanos (Coles, 1989). El mayor incremento del hematocrito se observó en los Grupos C, D y E. Sin embargo, este efecto pudo ser debido a que en estos grupos los animales fueron afectados con el virus del moquillo canino y desarrollaron signos clínicos de la enfermedad, tales como diarrea, depresión y anorexia; los cuales pueden ser factores que incrementen el hematocrito de manera relativa, al causar deshidratación (Appel y Summers, 1999; Greene y Appel, 2000).

En cuanto a las proteínas plasmáticas se refiere, a pesar de que no se observó diferencia estadísticamente significativa entre los grupos a lo largo del trabajo experimental *in vivo*, se puede observar que a partir del día 17 post-infección hay un descenso en la concentración de proteínas totales plasmáticas. Este fenómeno se puede deber a que las inmunoglobulinas

salen del torrente sanguíneo al sitio de lesión y/o replicación viral (Vandeveldel, 2004; Wünschmann *et al.*, 2000), o bien a que los cachorros infectados con el CDV presentaron anorexia y lesión intestinal, evitando la absorción de nutrientes (aminoácidos) indispensables para la síntesis de proteínas sanguíneas como lo es la albúmina.

Subpoblaciones de linfocitos.

La cantidad de linfocitos CD4+ no mostró una alteración que pueda ser atribuible a la infección con el CDV, ni al tratamiento con FT, se mantuvo constante entre 8 y 17% ($0.5 - 2.9 \times 10^9 / L$) de las células sanguíneas; esto difiere de lo observado en otros estudios donde se ha visto una disminución importante de este grupo celular a partir de los 3 días PI (Schobesberger *et al.*, 2005). Se ha comprobado que las células CD4+ son las más afectadas por la infección con este virus (Iwatsuki *et al.*, 1995; Wünschmann *et al.*, 2000).

Respecto a la cantidad de linfocitos CD8, estos mostraron una elevación importante en los grupos infectados a partir del día 5 PI, y para el día 32 se observó una diferencia estadísticamente significativa entre los grupos infectados y con tratamiento de FT (Grupos D y E) en relación al grupo infectado pero sin tratamiento (grupo C) y al grupo con tratamiento pero sin infección (Grupo B). Es interesante el hecho de que las células T CD8+ se incrementaron solamente cuando los animales tenían infección por CDV y además tratamiento con FT, ya que diversos estudios indican el aumento en la actividad de los linfocitos en individuos sanos (Vacek *et al.*, 1997; De la Fuente-Granada *et al.*, 2006). Se ha postulado que este biológico modula el sistema inmune, promoviendo la proliferación clonal de los linfocitos T, además de actuar como mitógeno, acelerando la producción y diferenciación de las células linfoides al estimular la producción de citocinas (Kirkpatrick 1989; Mateos *et al.*, 1992; Fabre *et al.*, 2004; Miranda *et al.*, 2005). Por otro lado, el mayor aumento en los CD8 se presentó en el Grupo E, tratado con FT no específico, lo cual sugiere que puede haber una transferencia de inmunidad celular cruzada entre alguno de los antígenos a los cuales eran sensibles los donadores de sangre (humanos) y el CDV, posiblemente sea un efecto causado por la vacuna de sarampión que la población suele tener; sin embargo se requiere más investigación al respecto.

Determinación de anticuerpos anti CDV .

A través de la determinación de Ig G anti-CDV se corroboró la presencia del virus en los animales inoculados. Esto es muy importante ya que valida que el trabajo experimental se haya desarrollado de la forma planeada y esperada, en donde los animales no inoculados fueron negativos a lo largo del periodo experimental, y viceversa. En los grupos con infección por CDV se observó elevación de los títulos de anticuerpos a partir del día 10, tal como lo señalan Greene y Appel (2000) y Appel (1969 y 1999). Sin embargo, no se observó un efecto del FT sobre este parámetro ya que el grupo que desarrolló una mayor cantidad de IgG fue el Grupo C que fue inoculado con CDV, pero no fue tratado con FT.

Aislamiento viral.

Para confirmar la infección se realizó el aislamiento viral a partir de las muestras de timo, linfonodos bronquiales, pulmón y SNC, demostrando al agente viral mediante el efecto citopático característico en los cultivos y confirmando por inmunofluorescencia, como lo señalan Seki *et al.* (2003) y Lednicky *et al.* (2004). Estas dos pruebas fueron utilizadas como confirmatorias de que el virus inoculado infectó a los perros de los Grupos C, D y E.

Examen morfológico.

Las lesiones macroscópicas más constantes y predominantes observadas en este trabajo fueron la neumonía intersticial y la enteritis catarral, lo que coincide con datos reportados por Appel (1969), Krakowka *et al.* (1979) e Iwatsuki *et al.* (1995) para perros afectados por moquillo canino.

Los hallazgos histológicos más relevantes fueron los que involucraban al tejido linfoide, los cuales consistieron en linfo necrosis sobre todo en los individuos que pertenecieron al Grupo C infectado con el virus de CDV, sin tratamiento con FT. Esto es consistente con lo informado por Wünschmann *et al.* (2000), quienes describen que el tejido primario de replicación viral es el tejido linfoide, ocasionando necrosis y apoptosis; lo cual causa los estados de inmunodepresión en los animales afectados. Los resultados de este experimento también coinciden con una menor lesión a los tejidos linfoides cuando está presente el FT,

lo cual suponemos que minimiza la inmunodepresión en los animales infectados por el CDV (Estrada *et al.*, 1998; Fabre *et al.*, 2004).

La inflamación eosinofílica observada en intestino y la neumonía intersticial que se presentó en todos los grupos, pudo haber sido causada por la infestación con *Toxocara canis* que se presentó en la totalidad de los animales previo al inicio de este trabajo experimental, tal como lo describen Kayes *et al.* (1987) y Pinelli *et al.* (2005).

Respecto a la signología y lesiones del SNC, Appel *et al.* (1982) describe diferencias entre las cepas conocidas de CDV, señalando que la cepa Snyder Hill, que fue la utilizada en este trabajo produce poliencfalitis aguda y a veces ninguna lesión antes de los 28 días PI. Se sabe también que los mioclonus son el signo clínico más frecuente en los casos de infección natural por el CDV (Koutinas *et al.*, 2002).

Las lesiones histológicas fueron significativamente más leves en los grupos tratados con FT, en comparación con el grupo infectado que no recibió el tratamiento; esto a pesar de que este último presentó menor signología clínica (ver Cuadro 5 y Figura 19). Sería importante realizar un periodo más prolongado de evaluación, donde la enfermedad continuara su curso natural para poder observar diferencias en el cuadro clínico.

8. CONCLUSIONES

Con los datos obtenidos y analizados en el trabajo aquí expuesto, se puede concluir lo siguiente:

- 1.- El tratamiento con FT específico y no específico no disminuyó la presentación clínica de la enfermedad de moquillo canino experimentalmente inducida.
- 2.- La cantidad de leucocitos totales y linfocitos se elevó después de la administración de FTe sólo en los animales con infección por CDV.
- 3.- El tratamiento con FT específico y no específico utilizado en este trabajo no mostró influencia sobre la cantidad de linfocitos T CD4+.
- 4.- El tratamiento con FT tanto específico como no específico, modificó de manera importante la cantidad de linfocitos T CD8+, aumentando su cantidad en animales infectados con CDV.
- 5.- Bajo las condiciones experimentales llevadas a cabo en este trabajo no se observó efecto del FT sobre la cantidad de anticuerpos específicos de tipo IgG contra CDV.
- 6.- Las lesiones en los tejidos provocadas por el virus de moquillo canino, disminuyeron en cantidad y severidad al utilizar el protocolo de tratamiento con FT no específico descrito en el presente trabajo.

9. LITERATURA CITADA

- Abbas AK** y **Lichtman AH**. "Immunología celular y molecular". Elsevier, 5ª edición, España, 2004.
- Alvarez-Thull L** y **Kirkpatrick CH**. *Profiles of cytokine production in recipients of transfer factors*. Biotherapy. 9:55-59, 1996.
- Appel MJ**. *Pathogenesis of Canine distemper*. Am J Vet Res. 30(7):1167-1181, 1969.
- Appel MJ**. *Distemper pathogenesis in dogs*. J Am Vet Med Assoc. 156(12):1681-1684, 1970.
- Appel MJ**, **Shek WR** and **Summers BA**. *Lymphocyte-mediated immune cytotoxicity in dogs infected with virulent canine distemper virus*. Infection and Immunity. 37(2):592-600, 1982.
- Appel MJG** and **Summers BA**. *Canine Distemper: Current Status*. In: *Recent Advances in Canine Infectious Diseases*, Carmichael L (Ed) 1999. International Veterinary Information Service, Ithaca NY (www.ivis.org), Available from: http://www.ivis.org/advances/Infect_Dis_Carmichael/appel_es/chapter_frm.asp?LA=2
- Axthelm MK** y **Krakowka S**. *Canine distemper virus-induced thrombocytopenia*. Am J Vet Res. 48(8):1269-1275, 1987.
- Barclay AJ**, **Paton DJ**. *Hendra (equine morbillivirus)*. Vet J. 160(3):169-176, 2000.
- Barrett T**. *Morbillivirus infections, with special emphasis on morbilliviruses of carnivores*. Vet Microbiol; 69(1-2):3-13, 1999.
- Berrón PR** et al. *Indications, usage and dosage of the transfer factor*. Revista Alergia México. 54(4):134-139, 2007.
- Brodersen R**, **Bijlsma F**, **Gori K**, **Jensen KT**, **Chen W**, **Dominguez J**, **Haverson K**, **Moore PF**, **Saalmüller A**, **Sachs D**, **Slierendrecht WJ**, **Stokes C**, **Vainio O**, **Zuckermann F**, **Aasted B**. *Analysis of the immunological cross reactivities of 213 well characterized monoclonal antibodies with specificities against various leucocyte surface antigens of human and 11 animal species*. Vet. Immunol. And Immunopath. 64:1-13, 1998.
- Calzada G**. *Uso en lechones de factor de transferencia y Parapoxvirus (Buypamun) en la vacunación contra la enfermedad de Aujeszky*. (Tesis de Maestría en Ciencias con especialidad en Inmunología). ENCB, IPN, México, 2000.
- Calzada NLA**, **García HJF**, **Retana RA**. *Evaluación clínica de la aplicación del factor de transferencia en perros afectados por el moquillo canino*. Revista AMMVEPE 9(5):173-175, 1998.
- Cano OL**. *Evaluación de la respuesta inmunológica de lechones tratados con el factor de transferencia* (Tesis de Maestría). FES-Cuautitlán, UNAM, México, 2001.
- Carter GR**, **Wise DJ** and **Flores EF**. *Paramyxoviridae*. In: **Carter GR**, **Wise DJ** and **Flores EF** (Eds) *A Concise Review of Veterinary Virology*. 2005. International Veterinary Information Service, Ithaca NY (www.ivis.org), Available from: <http://www.ivis.org/advances/carter/Part2Chap18/chapter.asp?LA=1>

- Chvala S**, Benetka V, Möstl K, Zeugswetter F, Spersger J, Weissenböck H. Simultaneous canine distemper virus, canine adenovirus type 2, and Mycoplasma cynos infection in a dog with pneumonia. *Vet Pathol.* 44(4):508-512, 2007.
- Coles EH**. "Diagnóstico y patología en veterinaria". Interamericana, 4ª edición, México, 1989.
- Cordero MMA**, Flores SG, Orea SM, Estrada PS, Serrano ME. *Safety and efficacy of treatment for severe atopic dermatitis with cyclosporin A and transfer factor.* *Rev Alerg Mex.* 46(2):49-57, 1999.
- Damian M**, Morales E, Salas G, Trigo FJ. *Immunohistochemical detection of antigens of distemper, adenovirus and parainfluenza viruses in domestic dogs with pneumonia.* *J Comp Pathol.*; 133(4):289-293, 2005.
- De la Fuente-Granada M**, Estrada-García I, Estrada-Parra S, Pérez-Tapia SM. *Análisis in vitro de subpoblaciones linfocitarias estimuladas con extracto dializable de leucocitos (Transferon).* 1^{er} Encuentro International sobre Factor de Transferencia "Sherwood Lawrence". ENCB-IPN, México. Pag. 17, 2006.
- Diallo A**. *Morbillivirus group: genome organisation and proteins.* *Vet. Microbiology.* 23:155-163, 1990.
- Dwyer JM**. *Transfer factors in the age of molecular biology: a review.* *Biotherapy.* 9(1-3):7-11, 1996.
- Engelhardt P**, Wider M, Zurbriggen A, Gröne A. *Canine distemper virus associated proliferation of canine footpad keratinocytes in vitro.* *Vet. Microbiology.* 107: 1-12, 2005.
- Estrada PS**, Velasco Co, Rébora F, Díaz ML, Padierna J. *Inmunoterapia de la tuberculosis pulmonar avanzada con factor de transferencia específico.* *Salud Pública Mex.* 25:579-588, 1983.
- Estrada PS**. *Immunotherapy with transfer factor of recurrent herpes simplex type I.* *Arch Clin. Res.* 26:587-592, 1995.
- Estrada PS**, Nagaya A, Serrano E, Rodríguez O, Santamaria V, Ondarza R, Chávez R, Correa B, Monges A, cabezas R, Calva C, Estada GI. *Comparative study of transfer factor and acyclovir in the treatment of herpes zoster.* *Int J Immunophar.* 20:521-535, 1998.
- Estrada PS**, et al. *El sistema inmune y el uso del factor de transferencia.* *Ciencia UANL*, Vol. II: 237-249, 1999.
- Fabre RA**, Perez TM, Aguilar LD, Rangel MJ, Estrada-Garcia I, Hernandez-Pando R, Estrada Parra S. *Transfer factors as immunotherapy and supplement of chemotherapy in experimental pulmonary tuberculosis.* *Clin Exp Immunol.* 136(2):215-223, 2004.
- Fauquet CM**, Mayo J, Maniloff U, Desselberger U, Ball LA (editors). *Virus taxonomy. 8th. Report of the international committee on taxonomy of viruses.* Elsevier, 2005.
- Fenner F**. et al. *Virología Veterinaria.* Editorial Acribia, España, 1992.
- Fernández OC**, Dubed M, Ramos Y, Navea L, Alvarez G, Lobaina L, López L, Casillas D, Rodríguez L. *Non-induced leukocyte extract reduces HIV replication and TNF secretion.* *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 325: 1075-1081, 2004.

- Ferrer-AVE**, Romero-CR, Hernandez-ML, Arista-VA, Rojo-MJ, Balseca-OF, Fierro M, Gonzalez-CR. *Successful treatment of severe complicated measles with non-specific transfer factor*. *In Vivo*. 8(4):555-557, 1994.
- Flores SG**, Gomez VJ, Orea SM, Lopez TJ, Serrano E, Rodriguez A, Rodriguez A, Estrada PS, Jimenez SN. *Transfer factor as specific immunomodulator in the treatment of moderate-severe atopic dermatitis*. *Rev Alerg Mex*. 52(6):215-220, 2005.
- Franco MMA**, Mendoza GE, Castillo LL, Tamez GRS, Rodríguez PC. *Bovine dializable leukocyte extract protects against LPS-induced, murine endotoxic shock*. *Int. Immunopharmacology*. 4: 1577-1586, 2004.
- Frisk AL**, König M, Moritz A, Baumgärtner W. *Detection of canine distemper virus nucleoprotein RNA by Reverse Transcription-PCR using serum, whole blood, and cerebrospinal fluid from dogs with distemper*. *J. Clin. Microbiol*. 37(11):3634-3643, 1999.
- Fujisawa T**, Yamaguchi Y. *Postoperative immunostimulation after complete resection improves survival of patients with stage I nonsmall cell lung carcinoma*. *Cancer*. 78(9):1892-1898, 1996.
- Greene CE**, Appel MJ. *Moquillo canino, en Enfermedades infecciosas de perros y gatos*. 2ª edición. Interamericana McGraw-Hill, México, 2000. pp. 11- 25.
- Griot C**, Moser C, Cherpillod P, Bruckner L, Wikket R, Zurbriggen A, Zurbriggen R. *Early DNA vaccination of puppies against canine distemper in the presence of maternally derived immunity*. *Vaccine*. 22:650-654, 2004.
- Iwatsuki K**, Okita M, Ochikubo F, Gemma T, Shin YS, Miyashita N, Mikami T and Kai C. *Immunohistochemical analysis of the lymphoid organs of dogs naturally infected with canine distemper virus*. *J of Comp. Pathology*. 113:185-190, 1995.
- Kapil S**, Allison RW, Johnston L, Murray BL, Holland S, Meinkoth J, and Johnson B. *Canine Distemper Virus Strains Circulating among North American Dogs*. *Clin Vaccine Immunol*. 15(4):707-712, 2008.
- Kayes SG**, Jones RE, Omholt PE. *Use of bronchoalveolar lavage to compare local pulmonary immunity with the systemic immune response of *Toxocara canis*-infected mice*. *Infection and Immunity*. 55(9):2132-2136, 1987.
- Keawcharoen J**, Theamboonlers A, Jantaradsamee P, Rungsipipat A., Poovorawan Y, Oraveerakul K. *Nucleotide sequence analysis of nucleocapsid protein gene of canine distemper virus isolates in Thailand*. *Vet. Microbiology*. 105:137-142, 2005.
- Kim D**, Jeoung SY, Ahn SJ, Pak SI, K HM. *Comparison of tissue and fluid samples for the early detection of canine distemper virus in experimentally infected dogs*. *J. Vet. Med. Sci*. 68(8): 877-879, 2006.
- King GK**, Yates KM, Greenlee PG, Pierce KR, Ford CR, McAnalley BH, Tizard IR. *The effect of Acemannan Immunostimulant in combination with surgery and radiation therapy on spontaneous canine and feline fibrosarcomas*. *Journal of the American Animal Hospital Association*. 31(5):439-447, 1995.
- Kirkpatrick CH**, Rozzo SJ, Mascali JJ. *Murine transfer factor III. Specific interactions between transfer factor and antigen*. *The Journal of Immunology*. 135(6):4027-4033, 1985.

- Kirkpatrick CH.** *Transfer factor.* J. Allergy Clin. Immunol. 81:803-813, 1988.
- Kirkpatrick CH.** *Biological response modifiers. Interferons, interleukins and transfer factor.* Ann. Allergy. 62:170-176, 1989.
- Kirkpatrick CH.** *Structural nature and functions of transfer factors.* Ann. N. Y. Acad. Sci. 685:362-368, 1993.
- Kirkpatrick CH, Hamad AR, Morton LC.** *Murine Transfer factors: Dose-response relationships and routes of administration.* Cellular Immunology. 164: 203-206, 1995.
- Kirkpatrick CH.** *Transfer factors: Identification of conserved sequences in transfer factor molecules.* Molecular Medicine. 6(4):332-341, 2000.
- Krakowka S, Higgins RJ, Koestner A.** *Canine distemper virus: review of structural and functional modulations in lymphoid tissues.* Am J Vet Research. 41(2): 284-292, 1979.
- Krakowka S.** *Canine distemper virus infectivity of various blood fractions for central nervous system vasculature.* J Neuroimmunol.; 21(1):75-80, 1989.
- Kreeger JM, Snider TG, Olcott BM.** *Effects of dialyzable lymph node extracts on lymphoblast proliferative capacity of blood mononuclear cells in cattle with chronic paratuberculosis.* Am J Vet Res; 53(7):1225-1230, 1992.
- Kouomou DW, Wild TF.** *Adaptation of wild-type measles virus to tissue culture.* J. of Virology. 76(3):1505-1509, 2002.
- Koutinas AF, Polizopoulou ZS, Bäümgaertner W, Lekkas S, Kontos V.** *Relation of clinical signs to pathological changes in 19 cases of canine distemper encephalomyelitis.* J. Comp. Pathology. 126:47-56, 2002.
- Lan NT, Yamaguchi R, Uchida K, Sugano S, Tateyama S.** *Growth profiles in recent canine distemper isolates on Vero cells expressing canine signaling lymphocyte activation molecule (SLAM).* J. Comp Pathology. 133:77-81, 2005.
- Lawrence HS.** *The transfer factor in humans of delayed skin sensitivity to the streptococcal M substance and to tuberculin with disrupted leucocytes.* J. Clin Invest. 64:219-230, 1954.
- Lawrence HS.** *A new basis for the immunoregulatory activities of transfer factor—an arcane dialect in the language of cells.* Cell Immunol. 82(1):102-116, 1983.
- Lednický JA, Meehan TP, Kinsel MJ, Dubach J, Hungerford LL, Sarich NA, Witecki KE, Braid MD, Pedrak C, Houde CM.** *Effective primary isolation of wild-type canine distemper virus in MDCK, MV1 Lu and Vero cells without nucleotide sequence changes within the entire haemagglutinin protein gene and in subgenomic sections of the fusion and phospho protein genes.* J. of Virological Methods. 118:147-157, 2004.
- Levin AS, Spittler LE, Stites DP, Fudenberg HH.** *Wiscott-Aldrich syndrome, a genetically determined cellular immunologic deficiency: clinical and laboratory responses to therapy with transfer factor.* Proc. Nat. Acad. Sci. 67(2):821-828, 1970.

- Lucero CF.** *Immunoestimulantes empleados en caninos* (Revisión bibliográfica y experiencias clínicas) (Tesis de licenciatura). FES-Cuautitlán, UNAM, México, 1996.
- Luna BGA,** Santacruz VC, Aguilar VG, Chávez R, Pérez TM, Estrada GI, Estrada PS, Jiménez MMC. *Evaluation of systemic immune response to herpetic keratitis in patients treated with transfer factor.* 1^{er} Encuentro Internacional sobre Factor de Transferencia “Sherwood Lawrence”. ENCB-IPN, México. Pag. 11, 2006.
- Luna BGA,** Linares M, Santacruz VC, Aguilar VG, Chávez R, Pérez TM, Estrada GI, Estrada PS, Jiménez MMC. *Immunological study of patients with herpetic stromal keratitis treated with dialyzable leukocyte extracts.* 13th International Congress of Immunology. Brazil. 67-71, 2007.
- Lunn DP** and **Rush BR.** *Immunomodulation: Principles and Mechanisms.* In: 50th Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners, 2004 - Denver, CO, USA, (Ed.). Publisher: American Association of Equine Practitioners, Lexington KY. Internet Publisher: International Veterinary Information Service, Ithaca NY (www.ivis.org), Last updated: 4-Dec-2004; P1480.1204.
- Male DK,** Brostoff J, Roth DB, Roitt IM. *Immunología.* 7^a edición. Elsevier, España, 2007. .
- Martínez-Cairo CS,** Alasio CC, Dávila VJR. *In vitro transfer of immunity against PPD with dialyzable extract of leukocytes from human calostrum.* Rev Alerg. 39(6):126-132, 1992.
- Martínez MCE.** *Modulación de la respuesta inmune.* Tendencias vigentes [artículo en línea]. MEDISAN 2005;9 (3). http://bvs.sld.cu/revistas/san/vol9_3_05/san06305.htm
- Masi M,** De Vinci C, Baricordi OR. *Transfer factor in chronic mucocutaneous candidiasis.* Biotherapy. 9(1-3):97-103, 1996.
- Mateos RA,** Posadas ME, Retana RA, Ordoñez BMA, Ulloa AR, Flores CR. *El factor de transferencia como biológico en la inmunoterapia de becerros lactantes clínicamente enfermos.* Vet. Mex. XXIII: 4, 309-313, 1992.
- Megid J,** Dias Junior JG, Aguiar DM, Nardi Júnior G, Silva WB, Ribeiro MG. *Tratamento da papilomatose canina com Propionibacterium acnes.* Arq. Bras. Med. Vet. Zootec..53(5):574-576, 2001.
- Miranda HE,** Ríos MAM, Cruz ST, Salas MA, Romero RA. *Utilización del inmunomodulador RS-100 en el tratamiento de dermatitis micótica crónica en un equino.* Vet. Mex. 36(3):361-366, 2005.
- Moreno CBR, Flores OG y Sandoval GMP** .“*Manual de técnicas de necropsia, Patología General*”. FES-Cuautitlán, UNAM, México, 2006.
- Morfin-Maciel BM.** *Demodicidosis in a female patient treated as allergic blepharoconjunctivitis.* A case report. Rev Alerg Mex. 50(6):232-236, 2003.
- Murphy FA** et al. “*Veterinary Virology*”. Academic Press, USA, 1999. pp. 411- 428.
- Nishi T,** Tsukiyama-Kohara K, Togashi K, Kohriyama N, Kai C. *Involvement of apoptosis in syncytial cell death induced by canine distemper virus.* Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases. 27:445-455, 2004.

- Ojeda MO**, van't Veer C, Fernández OCB, Arana RMJ, Buurman WA. *Dialyzable leukocyte extract differentially regulates the production of TNF α , IL-6, and IL-8 in bacterial component-activated leukocytes and endothelial cells.* *Inflamm Res.* 54(2):74-81, 2005.
- Orozco TT**, Solano MO, Sandoval GF, Vera JG, Parra SE. *Inflammatory mediators in patients with atopic dermatitis after treatment with transfer factor.* *Rev Alerg Mex.* 51(4):151-154,2004.
- Otani I**, Niwa T, Tajima M, Ishikawa A, Watanabe T, Tsumagari S, Takeishi M, Kanayama K. *CD56 is expressed exclusively on CD3+ T lymphocytes in canine peripheral blood.* *J. Vet. Med. Sci.* 64(5):441-444, 2002.
- Pineda B**, Estrada-PS, Pedraza MB, Rodríguez-RA, Perez R, Arrieta O. *Interstitial transfer factor as adjuvant immunotherapy for experimental glioma.* *J Exp Clin Cancer Res.* 24(4):575-583, 2005.
- Pinelli E**, Withagen C, Fonville M, Verlaan A, Dormans J, van Loveren H, Nicoll G, Maizels RM, van der Giessen J. *Persistent airway hyper-responsiveness and inflammation in Toxocara canis-infected BALB/c mice.* *J Clin Exp Allergy.* 35(6):826-832, 2005.
- Pringle CR.** *Virus taxonomy--1999. The universal system of virus taxonomy, updated to include the new proposals ratified by the International Committee on Taxonomy of Viruses during 1998.* *Arch Virol;* 144(2):421-429, 1999.
- Reed LPJ**, Muench H. *A simple method of estimating fifty percent end points.* *Amer. J. Hyg.* 27:493-497, 1938.
- Rodríguez RA**, Estrada PS, Olvera PB, Rodríguez RI, Castillo GE. *Factor de transferencia y cáncer,* *Revista FESC.* 3(10) oct-dic, 2003.
- Saito TB**, Alfieri AA, Wosiacki SR, Negrao FJ, Morais HS, Alfieri AF. *Detection of canine distemper virus by reverse transcriptase-polymerase chain reaction in the urine of dogs with clinical signs of distemper encephalitis.* *Res Vet Sci.;* 80(1):116-9, 2006.
- Salazar VRM**, Mejia OJ. *Use of transfer factor in allergic bronchial asthma.* *Rev Alerg.* 40(2):42-45,1993.
- Schobesberger M**, Summerfield A, Doherr MG, Zurbriggen A, Griot C. *Canine distemper virus-induced depletion of uninfected lymphocytes is associated with apoptosis.* *Vet Immunol. and Immunopath.* 104:33-44, 2005.
- Seki F**, Ono N, Yamaguchi R, Yanagi Y. *Efficient isolation of wild strains of canine distemper virus in Vero cells expressing canine SLAM (CD150) and their adaptability to marmoset B95a cells.* *J. of Virology.* 77(18):9943-9950, 2003.
- Simon-Martínez J**, Ulloa AR, Soriano VE, Fajardo R. *Identification of a genetic variant of canine distemper virus from clinical cases in two vaccinated dogs in Mexico.* *Vet Journal.* 175(3):423-426, 2008.
- Stein VM**, Czub M, Schreiner N, Moore PF, Vandeveld M, Zurbriggen A, Tipold A. *Microglial cell activation in demyelinating canine distemper lesions.* *J. of Neuroimmunology.* 153:122-131, 2004.
- Tatsuo H**, Ono N, Yanagi Y. *Morbilliviruses use signaling lymphocyte activation molecules (CD150) as cellular receptors.* *J. of Virology.* Vol 75, Nº 13, pp. 5842-5850, 2001.

- Tizard IR.** *Inmunología veterinaria*. 6ª edición. McGraw-Hill Interamericana, México, 2002.
- Uema M, Ohashi K, Wakasa C, Kai C.** *Phylogenetic and restriction fragment length polymorphism analyses of hemagglutinin (H) protein of canine distemper virus isolates from domestic dogs in Japan*. Virus Research. 109:59-63, 2005.
- Uriel-Carmona J, Giraldo CE, Loaiza MJ.** *Tratamiento de papilomatosis oral canina con cimetidina: ¿una nueva alternativa?* Med. Vet. 20(1):5-10, 2002.
- Vacek A, Barnet K, Hofer M, Cehc K, Pekarek J.** *Stimulation of hemopoietic colony formation from mouse marrow cells in vitro using human dialyzable leukocyte extracts-Immodin-sevac*. Int J Immunopharmac, 19(8):431-436, 1997.
- Vandeveldel M, Zurbriggen A.** *The neurobiology of canine distemper virus infection*. Veterinary Microbiology, 44:271-280, 1995.
- Vandeveldel M.** The pathogenesis of nervous distemper. 2004. 29th Congress of the World Small Animal Veterinary Association. Greece. Available from: <http://www.vin.com/proceedings/Proceedings.plx?CID=WSAVA2004&PID=8564&O=Generic>
- von Messling V, Springfield C, Devaux P, Cattaneo R.** *A ferret model of canine distemper virus virulence and immunosuppression*. J. of Virology. 77(23):12579-12591, 2003.
- Wilson GB, Fudenberg HH, Keller RH.** *Guidelines for immunotherapy of antigen-specific defects with transfer factor*. J Clin Lab Immunol. 13(2):51-58, 1984.
- Wünschmann A, Kremmer E, Baumgärtner W.** *Phenotypical characterization of T and B cell areas in lymphoid tissues of dogs with spontaneous distemper*. Vet Immunol. and Immunopath. 73:83-98, 2000.
- Zaldivar QN, Puebla DH, García FZ, González RO, Almaguer PY, Ferrales ZY.** *Características del estado clínico y respuesta del sistema inmune en bovinos leucócicos estimulados con levamisol*. Rev. Prod. Anim. 14(1):47-49, 2002.

10. ANEXOS

10.1. FORMATO DE LA HOJA CLÍNICA

OBSERVACIONES (Anotar sólo la clave)

1. APARIENCIA: 1.1 NORMAL 1.2 DEPRIMIDO 1.3 COMATOSO/MUERTO	2. APETITO: 2.1 NORMAL 2.2 REDUCIDO 2.3 ANOREXIA	3. EXCREMENTO: 3.1 NORMAL 3.2 SECO 3.3 FLUIDO	4. OJOS: 4.1 NORMALES 4.2 ACUOSOS 4.3 SECOS 4.4 HUNDIDOS 4.5 LEGAÑAS
5. RESPIRACION: 5.1 NORMAL 5.2 ESTORNUDOS 5.3 TOS 5.4 DISNEA	6. ORIFICIOS NAALES: 6.1 NORMALES 6.2 DESCARGA ACUOSA 6.3 DESCARGA MUCOSA 6.4 SECA/AGRIETADA	7. SIGNOS NERVIOSOS: 7.1 INCOORDINACION 7.2 DEBILIDAD/PARALISIS 7.3 CONTRAC. MUSCULAR 7.4 POSTRACION	

FECHA	ANIMAL	TEMPERATURA RECTAL	OBSERVACIONES

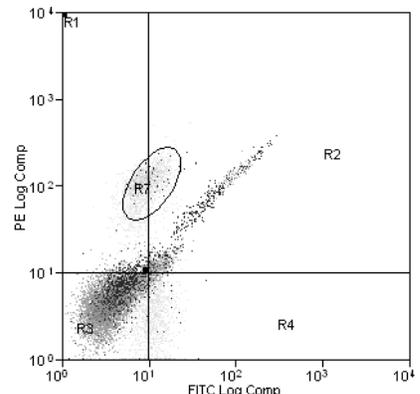
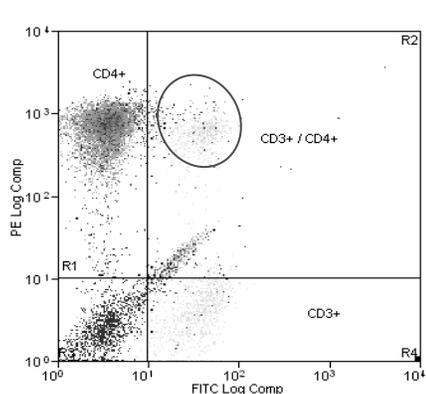
10.2. SOLUCIÓN DE LISIS PARA ERITROCITOS (10x)

8.2 g NH_4Cl (1.5 M) Cloruro de amonio
 0.84 g NaHCO_3 (100 mM) Bicarbonato de sodio
 0.37 g EDTA disódico (10mM)
 100 mL agua desionizada

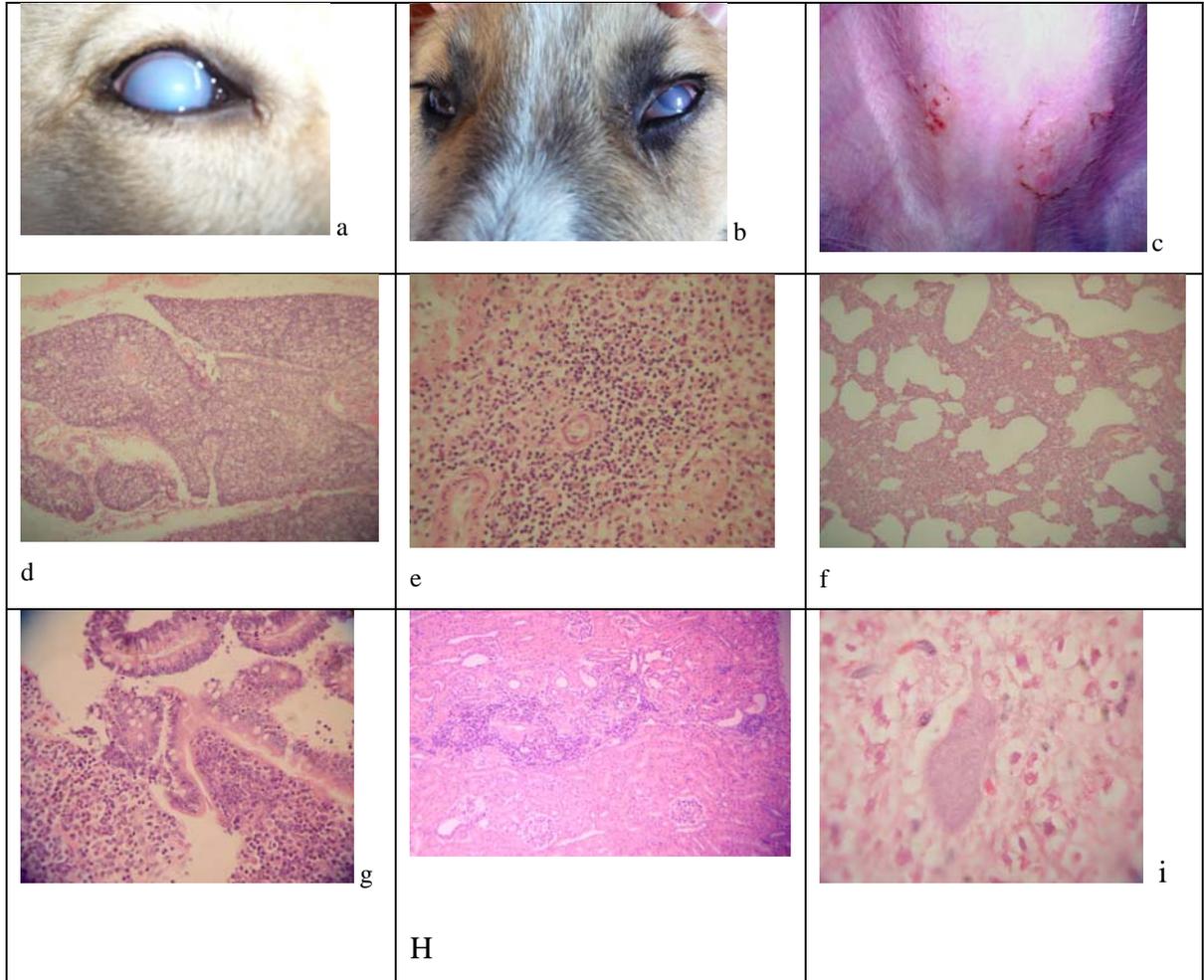
Ajustar el pH a 7.4, almacenar a 4 °C hasta 6 meses.

En el momento de usar diluir 1:10 y añadir 0.5% de paraformaldehído.

10.3. Figura 20. HISTOGRAMAS DE CITOMETRÍA DE FLUJO.

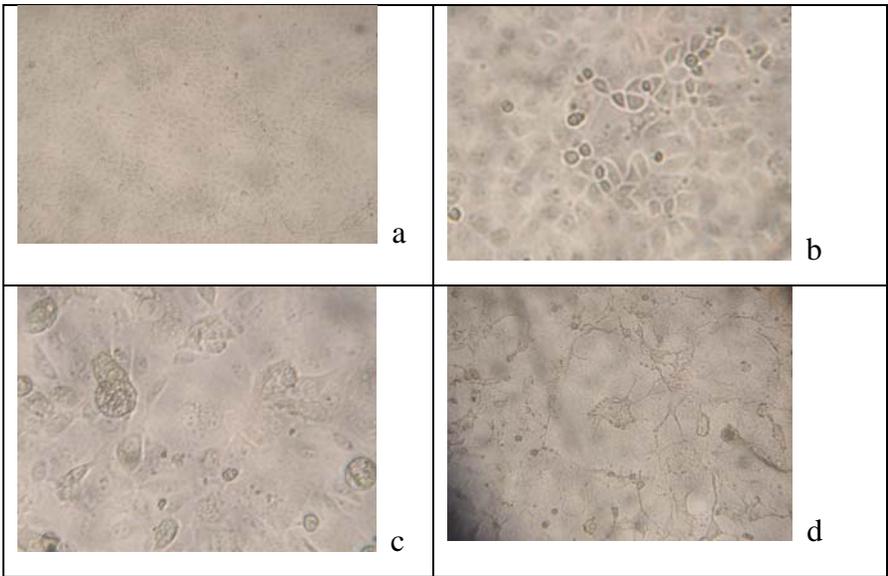


10.4. Figura 21. LESIONES MACRO Y MICROSCÓPICAS CAUSADAS POR INFECCIÓN EXPERIMENTAL CON CDV.



Tinción H-E. a-b). Uveítis con opacidad corneal; c) pústulas en piel del abdomen; d) timo, atrofia cortical; e) bazo, linfonecrosis; f) neumonía intersticial; g) enteritis linfocítica; h) nefritis intersticial; i) SNC, cuerpo de inclusión neuronal.

10.5. Figura 22. EFECTO CITOPÁTICO EN CÉLULAS MA-104, PRODUCIDO POR CDV RECUPERADO DE ANIMALES INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE.



a) cultivo control; b) sincitio; c) redondeamiento y vacuolización; d) sincitio y lisis celular.