



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA
Y ZOOTECNIA**

**IDENTIFICACIÓN DEL VIRUS DE MOQUILLO CANINO
EN MUESTRAS SANGUÍNEAS DE PACIENTES CON
ESCLEROSIS MÚLTIPLE**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
MÉDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA**

PRESENTA:

MIRIAM EDITH AMARO LARA

ASESORES:

**MVZ M en C Dr. Francisco Javier Basurto Alcántara
MC Esp en Neurología Sandra Quiñones Aguilar
MVZ M en C Samuel Genaro Jardón Herrera**

MÉXICO, D. F.

2007





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.

Dedico el presente trabajo:

A mi mamá Socorro Lara Nieto por apoyarme en todo momento y de todas las formas posibles además de enseñarme a ser perseverante.

A mi papá Jorge Amaro Orozco aunque fue poco el tiempo que compartimos, dejó huella en mí.

A mis hermanas quienes han sido ejemplo de fortaleza y por apoyarme en los planes que emprendo.

A mis hermanos porque de alguna forma han estado presentes durante mi formación.

A mis sobrinas (os) por el aprendizaje que hemos adquirido juntos.

A mis cuñadas (os) por el continuo interés y el apoyo brindado.

A Evaristo Iván Valdés Bautista por estar presente siempre en mi desarrollo personal y académico. Eres una persona indispensable en mi vida.

A María Elena del Razo, por ser todo lo que implica una gran amiga.

A mis “osos” quienes tuvieron gran influencia en la realización de este trabajo.

Esta es toda mi familia a quien dedico el presente trabajo por estas y muchas razones, la más importante es el amor recíproco que nos tenemos. Los amo.

AGRADECIMIENTOS:

A los pacientes diagnosticados con esclerosis múltiple que asisten a EMAC y que donaron su muestra, gracias por depositar su confianza en este trabajo.

A todas las personas que donaron muestras para la realización de este trabajo gracias por colaborar.

A todos los miembros del jurado: Dra. Patricia Noé, Dra. Socorro Lara, Dra. Araceli Lima y Dr. Daniel Martínez por las observaciones realizadas al presente trabajo y la pronta revisión del mismo.

Al Dr. Francisco Javier Basurto Alcántara por creer en la trascendencia del trabajo y generar los medios para su realización.

A la Dra. Sandra Quiñones Aguilar por la asesoría otorgada en la parte de medicina humana.

Al Dr. Samuel Genaro Jardón Herrera por su apoyo en la realización del trabajo.

Al Dr. Alejandro de la Peña Moctezuma por incorporarme al Departamento de Microbiología e Inmunología.

Al Dr. Raymundo Iturbe por otorgar las muestras de encéfalo y sangre con previo diagnóstico de moquillo canino mediante inmunofluorescencia. Además le agradezco los momentos de risa y conversación.

Al Biol. Fernando Guadarrama por dedicar parte de su valioso tiempo en asesorarme en lo relacionado al cultivo celular. Igualmente, agradezco al personal de Holland de México S. A de C.V. por la amabilidad en el trato durante mi estancia.

A la Dra. Lilia Núñez por darle un mejor cauce a la investigación al acercarme a EMAC.

Al Dr. Antonio Verdugo Rodríguez por otorgar financiamiento mediante los proyectos destinados al Laboratorio de Microbiología Molecular y por insistir en la importancia de la formación académica.

A los miembros del LMM por ser mi familia académica en la que encontré asesoría para el desarrollo de la tesis, además, de grandes amistades. Dra. Marce, Edith, Gaby, Ilane, Emma, Xochitl, Emilio, Mauricio, Adolfo, Julio, Luis, Marino gracias por compartir momentos de alegría y desesperación durante la realización del trabajo.

A la QFB Elvia Lazo por dirigirme en los aspectos técnicos del equipo y material de laboratorio. Gracias por tu amistad.

Al Dr. Alfredo Castañeda por asesorarme en los procedimientos experimentales, guiarme en la redacción de la tesis y por ser un gran amigo.

A la MVZ Elsa María Coria Galindo quien me encauzo en todo lo relacionado a la extracción de ARN y RT-PCR, gracias por compartirme lo que cuesta tanto esfuerzo.

A Karla Cano Ruíz por apoyarme en la realización de los ensayos y por tu amistad.

A la Sra. Francis por estar al pendiente de la limpieza y ubicación adecuada del material de laboratorio y por los momentos agradables de conversación.

A los miembros del Laboratorio de Virología: a la Dra. Magdalena (Male) por guiarme en los aspectos de cultivo celular y por compartir momentos gratos, a la Dra Laura Cobos por auxiliarme con material en momentos de suma urgencia; además, por los consejos para la realización de la RT-PCR. Armando y Alejandra gracias por apoyarme en la elaboración del material para cultivo celular, José Manuel por mantenerme al pendiente de los diagnósticos de los encéfalos con VMC y a la Dra. Liliana por estar siempre al pendiente del material del laboratorio.

A José Luis, Juan Carlos y la Dra. Fabiola por apoyarme en mi desempeño como ayudante de profesor.

A Rosalba y Lupita gracias por realizar amablemente mis trámites, formatos, justificantes, entre muchas cosas más.

Al Sr. Aurelio por apoyarme continuamente en la esterilización del material.

A los integrantes del Laboratorio de Tuberculosis por apoyarme en la digitalización de las imágenes y a Erika Carrillo por los consejos en el procedimiento de extracción de ARN.

Al Dr. Trigo, Dra Tron y Profra. Ángela por apoyarme de muchas formas para lograr terminar mis estudios y por mantenerse al pendiente de mi estado de salud.

Al Dr. Hugo Lecona Butrón por encauzarme al ámbito de la neurología clínica.

A la familia Valdés Bautista por todo el apoyo y confianza en lo que emprendo.

A la Máxima Casa de Estudios UNAM por ser la columna de mi formación académica y brindarme la oportunidad de ser Médica Veterinaria Zootecnista.

A todos ustedes **GRACIAS** por hacer posible este trabajo.

Este trabajo estuvo financiado por los proyectos PAPPIT IN205701, PAPPIT IN222907, SEP-CONACyT 2003 – CO2-45271, PAPPIT IN206106

CONTENIDO

	Página
RESUMEN	1
1. INTRODUCCIÓN.....	2
2. JUSTIFICACIÓN	23
3. HIPÓTESIS	24
4. OBJETIVOS.....	24
5. MATERIALES Y MÉTODOS	25
6. RESULTADOS	38
7. DISCUSIÓN.....	49
8. CONCLUSIONES	53
9. PROSPECTIVAS	54
10. REFERENCIAS	55
11. ANEXO DE PREPARACIÓN DE SOLUCIONES	69
12. ANEXO DE FORMATOS	72

ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS	Página
FIGURA 1	4
FIGURA 2	5
FIGURA 3	6
FIGURA 4	7
FIGURA 5.....	9
FIGURA 6.....	10

FIGURA 7.....	15
FIGURA 8.....	35
FIGURA 9.....	37
FIGURA 10.....	38
FIGURA 11.....	40
FIGURA 12.....	41
FIGURA 13.....	42
FIGURA 14.....	43
FIGURA 15	44
FIGURA 16	45
FIGURA 17.....	45
FIGURA 18.....	46
FIGURA 19.....	46
FIGURA 20.....	47
FIGURA 21.....	48
CUADRO 1.....	11
CUADRO 2	32
CUADRO 3	32
CUADRO 4	33
CUADRO 5.....	33
CUADRO 6	34
CUADRO 7.....	35
CUADRO 8.....	36
CUADRO 9.....	36

RESUMEN

AMARO LARA MIRIAM EDITH. Identificación del virus de moquillo canino en muestras sanguíneas de pacientes con esclerosis múltiple. (Bajo la dirección de: Dr. Francisco Javier Basurto Alcántara, Dra. Sandra Quiñones Aguilar y el MVZ M en C Samuel Genaro Jardón Herrera).

La esclerosis múltiple es una enfermedad neurológica inmunomediada que afecta al sistema nervioso central de los humanos y su etiología aún es desconocida. No obstante, se han considerado algunos factores que influyen en la presentación de la enfermedad, tal es el caso del virus de moquillo canino. Dicho agente viral ha sido asociado con la esclerosis múltiple, en trabajos previos realizados por otros autores sin poder concluir la presencia o ausencia del agente viral. Dado lo anterior, se estandarizó y utilizó la técnica de Transcripción Reversa – Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR) para detectar un fragmento de 696 pares de bases (pb) que corresponden a un fragmento del gen de la fosfoproteína del virus de moquillo canino, en 32 muestras sanguíneas de pacientes diagnosticados con EM que asisten a Esclerosis Múltiple Asociación Civil (EMAC); 10 muestras de personas dedicadas a la clínica de pequeñas especies y 10 muestras de personas que no han tenido como mascota a un perro o hurón. Se amplificó un fragmento del gen de β -actina como control, para determinar que los procedimientos utilizados habían sido realizados de manera correcta, debido a que se realizaron extracciones de ARN a partir de las muestras sanguíneas. Posteriormente se realizó el ensayo de PCR para la amplificación del virus, utilizándose como control positivo, células Vero infectadas con virus de moquillo canino cepa Onderstepoort. Los resultados mostraron un producto de peso molecular similar al del control positivo que fue amplificado a partir de una muestra donada por un paciente diagnosticado con esclerosis múltiple. Es preciso secuenciar el producto y determinar el origen de la amplificación, para afirmar o descartar la presencia del virus.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 ASPECTOS HISTÓRICOS DE LA ESCLEROSIS MÚLTIPLE.

La primera descripción de la esclerosis múltiple (EM) publicada fue atribuida a Carswell en 1838; posteriormente Valentiner en 1856 hizo mención de los cambios mentales y describió casos múltiples con exacerbaciones y remisiones; no obstante, fue hasta mediados de 1860's, cuando se reconoció una gran parte de las características clínicas y patológicas de la enfermedad; siendo Charcot quien en 1868 dibuja y añade observaciones al proceso de la patofisiología, haciendo hincapié en que la desmielinización era la causante de los síntomas de la EM. Aunque es hasta 1940 cuando Huxley y Stämpfli proponen que la conducción de las fibras mielinizadas, se realiza en forma saltatoria ¹. Investigaciones posteriores fueron encaminadas a demostrar experimentalmente los eventos de remielinización y plasticidad neuronal; siendo Bounge quien en 1961 advierte que la remielinización del SNC está dada por procesos diversos en los individuos y es en los ochenta cuando se describió un fenómeno de plasticidad neuronal en el que las fibras desmielinizadas pueden adquirir la habilidad de conducir continuamente los impulsos nerviosos, al desarrollar numerosos canales de sodio en los internodos de los axones ¹.

De igual forma, la experimentación respecto al tratamiento de la enfermedad ha sido amplia y diversa. Entre los tratamientos utilizados se encuentran los siguientes: la realización de la tonsilectomía, el tratamiento contra la malaria, la aplicación de la vacuna tifoidea, la administración parenteral de leche estéril, la utilización de mercurio y compuestos arsenicales ¹ y hacia la década de los ochenta se reconoce el uso de anticoagulantes, oxígeno hiperbárico ² y regímenes alimenticios basados en ácidos grasos polinsaturados ^{3, 4}. Estos tratamientos tenían como origen, diversas ideas acerca de la etiología de la enfermedad, entre las que destacan: agentes infecciosos, disturbios isquémicos y problemas metabólicos ^{1, 2, 3, 4}.

1.2 GENERALIDADES DE LA ESCLEROSIS MÚLTIPLE

La esclerosis múltiple (EM) es una enfermedad neurológica inmunomediada que afecta el sistema nervioso central (SNC) de los humanos ⁵. Se caracteriza por generar procesos de desmielinización y transección axonal. Estos procesos pueden ocasionar lesiones discapacitantes que en algunos casos resultan ser irreversibles. Aunado a ello, es importante referir que la EM se define como una enfermedad de etiología desconocida, que presenta una mayor incidencia en adultos jóvenes entre los 20 y 50 años de edad, siendo más frecuente en pacientes de sexo femenino, mostrando una relación 2:1 respecto del hombre ⁶.

1.3 SIGNOS Y SÍNTOMAS DE LA ESCLEROSIS MÚLTIPLE

Los signos y síntomas son diversos, de acuerdo a la localización de las lesiones; sin embargo, entre los signos más comunes, se pueden mencionar los siguientes: trastornos propioceptivos, de coordinación y de equilibrio; además de temblores, pérdida de la agudeza auditiva, dificultades en la función del habla como disartria y palabra escandida (emisión de las palabras entrecortadas y lentas) debido a la pérdida del control de labios, lengua, mandíbula y de la actividad respiratoria. Por otra parte, los signos que pocas veces son señalados, mas no por ello menos frecuentes, son la disfunción eréctil y la anorgasmia ^{5,6}.

Respecto a los síntomas que presentan los pacientes con EM se encuentran los siguientes: sensación de descargas eléctricas por efecto de lesiones medulares con mayor frecuencia en miembros inferiores, calambres, dolores musculares, espasticidad, mareos, mayor sensibilidad al calor, vértigo, neuralgia del trigémino por lesión en el tronco cerebral, dolores abdominales, diarrea o constipación por el mal funcionamiento del aparato digestivo y dolor en la región pélvica debido a la disfunción vesical, que origina retención urinaria ^{5,6}.

1.4 CURSO CLÍNICO DE LA ESCLEROSIS MÚLTIPLE

Se han determinado tres cursos clínicos que pueden tener la EM. Estos son esquematizados en la **Figura 1** y son referidos de manera numérica en el párrafo siguiente.

El curso **remite-recurrente**, es el más frecuente y se caracteriza por la presentación de brotes o exacerbaciones ^{1 7}. Después de cada brote se puede regresar al mismo estadio **(1)** o dejar secuelas irreversibles menores a las presentadas en el brote **(2)**; sin embargo, llega un momento en que el curso remite-recurrente cambia a **secundario progresivo**, es decir, el avance de la enfermedad se da de manera progresiva después de cada brote **(3)**. De igual forma, existe el curso **primario progresivo** que se caracteriza por un avance sostenido desde el comienzo de la enfermedad **(4)** y de forma menos frecuente este curso puede estabilizarse en algunos episodios **(5)** ⁸.

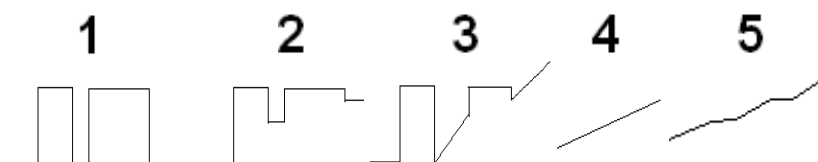


Figura 1. Curso clínico de la enfermedad. Basado en: Lublin FD, Reingold SC. Defining the clinical course of multiple sclerosis: results of an international survey. *Neurology* 1996;46:906-911.

1.5 PATOGENIA DE LA ESCLEROSIS MÚLTIPLE

En los pacientes con EM se han detectado linfocitos T activados, que pueden ser resultado directo de la inflamación y efectos necróticos, derivados de una infección viral. Así pues, estos linfocitos participan en la respuesta inmune sin estar involucrados en la lesión inicial viral, afectando órganos y tejidos (mecanismo

¹ Entendiéndose como exacerbación, ataque o recurrencia a un episodio de disturbios neurológicos, donde los estudios clínicopatológicos establecen como causa de la lesión, un proceso inflamatorio y de desmielinización. Este proceso lleva al menos 24 horas.

denominado *bystander activation*)^{9, 10}. Las citocinas liberadas por los linfocitos, estimulan a los astrocitos para que presenten antígenos¹¹; además de atraer linfocitos B, linfocitos T y macrófagos que cruzan la barrera hematoencefálica continuándose la presentación de antígenos en el SNC, que de manera habitual se considera un sistema inmunoprivilegiado¹². Dicho lo anterior, la inflamación es un evento crucial que contribuye a la severidad de la enfermedad¹³, provocando daños en la mielina y oligodendrocitos (células encargadas de la producción de mielina)^{14, 15, 16}, cuerpos neuronales y axones¹⁷ (**Figura 2**); en regiones como: tronco encefálico, médula espinal, cerebelo, nervio óptico y hemisferios cerebrales (región frontal, temporal y occipital)^{18, 19, 20}, generándose procesos como los que a continuación se mencionan:

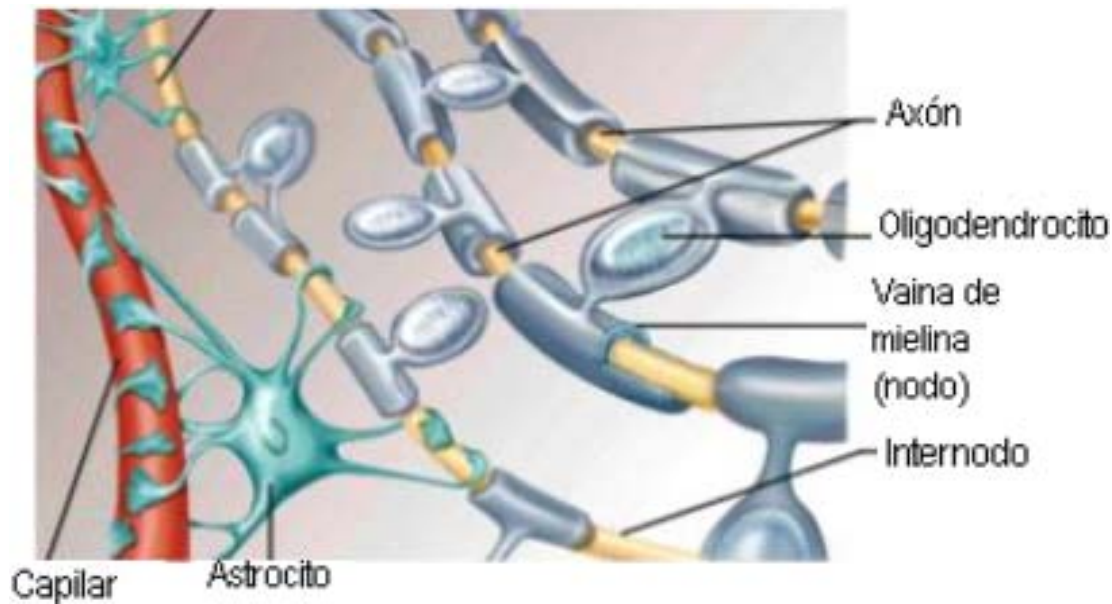


Figura 2. Esquemática de la barrera hematoencefálica. Tomada y modificada de: [Hwww.afh.bio.br/nervoso/img/Nervos49.jpg](http://www.afh.bio.br/nervoso/img/Nervos49.jpg)

- **Desmielinización.**

La desmielinización es un proceso común en pacientes con EM; que da el nombre a la enfermedad, debido a la visualización de placas esclerosantes (cicatrices) en múltiples regiones del SNC²¹. Dicho proceso se caracteriza por un acortamiento de la distancia entre los internodos (regiones del axón desprovistas de mielina) y por una disminución en el grosor de las capas de mielina provocando que el

impulso sea transmitido en forma lenta, ya que de forma normal se realiza de manera saltatoria, debido a que los nodos de mielina funcionan como aislante eléctrico ¹⁶.

Cabe mencionar, que una citocina importante en la generación de la desmielinización, es el factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) que al unirse a su receptor TNFR1 acelera la apoptosis de los oligodendrocitos; sin embargo, cuando esa misma citocina se une al receptor TNFR2 promueve la remielinización y media la proliferación de oligodendrocitos progenitores. Lo que hace resaltar, que las citocinas proinflamatorias también pueden tener efectos benéficos en la fase de recuperación de la enfermedad ²².

- **Degeneración axonal.**

Es preciso mencionar que en las exacerbaciones de la enfermedad, la principal causa de discapacidad es la inflamación a diferencia de la progresión crónica, en la que se considera importante la transección axonal ^{23, 24, 25}. Este corte en los axones puede llevar a la pérdida axonal debido a repetidos eventos inflamatorios ²⁶. **(Figura 3)**. Este evento puede determinarse mediante la evidencia de anomalías electrofisiológicas correlacionadas con evidencias clínicas como coordinación motora reducida y atrofia de la médula espinal ^{27, 28}; además de determinarse un decline del N-acetil-aspartato (NAA) ¹³. Cabe señalar que la muerte de los cuerpos neuronales llevan a lesiones axonales posteriores; sin embargo, no necesariamente una lesión en el axón lleva a la muerte neuronal ²⁹.

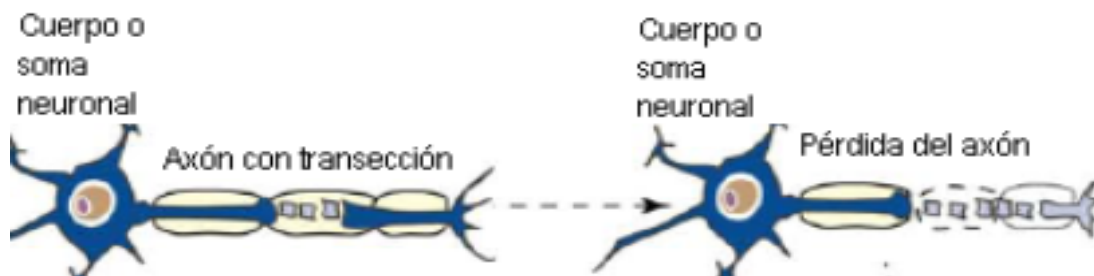


Figura 3. Degeneración walleriana. Tomado y modificado de : Zipp F, Aktas O. The brain as a target of inflammation: common pathways link inflammatory and neurodegenerative diseases. Trends in neurosciences 2006;3(1):1-9.

1.6 DIAGNÓSTICO DE LA ESCLEROSIS MÚLTIPLE

Existen ciertas dificultades en el diagnóstico de EM debido a la similitud con otros síndromes. Entre los que se encuentran: isquemia cerebral, síndrome de anticuerpos antifosfolípido, lupus eritematoso diseminado agudo, sífilis meningovascular, desórdenes paraneoplásicos y en el caso de niños y adolescentes es pertinente considerar desórdenes genéticos de la mielina como la leucodistrofia ⁷. De hecho, la EM en los años setenta era una enfermedad con diagnóstico poco habitual en México, existiendo una prevalencia de 3 a 4 pacientes por cada 100 mil habitantes; contrastando con cifras recientes las cuales oscilan entre 13 y 14 pacientes diagnosticados con EM por cada 100 mil habitantes ³⁰. Lo cual refleja un incremento en la prevalencia de la enfermedad (al menos de manera estadística), pudiendo atribuirse a diagnósticos subestimados o a un incremento en la exposición a determinados agentes infecciosos que desencadenen la enfermedad ³¹.

Cabe mencionar que de acuerdo con los datos recabados por la Federación Internacional de Esclerosis Múltiple hasta el 2006, la prevalencia mundial aproximada es la mostrada en la **Figura 4**.



Figura 4. Distribución global de la esclerosis múltiple. Tomada y modificada de: <http://www.atlasofms.org/>

Dicho lo anterior, es elemental la importancia de un diagnóstico certero de la enfermedad, para lo cual, se requiere de una demostración objetiva de la distribución en tiempo y espacio de las lesiones. Para lograrlo es esencial la combinación de los estudios clínicos (revisión de la historia clínica y examen físico) y paraclínicos ⁷ que a continuación se mencionan:

- Analisis de líquido cefalorraquídeo (LCR): es considerado como un estudio auxiliar en la detección de niveles elevados de IgG, en el estudio de bandas oligoclonales dando evidencia de la ruptura de la barrera hematoencefálica ³². De manera conjunta se examina la presencia de pleiocitosis mononuclear, se calcula el índice de IgG y se determina la presencia de anticuerpos contra la proteína básica de la mielina (MBP) proteína proteolipídica (PLP) y glicoproteína de la mielina de los oligodendrocitos (MOG) ³³. Cabe mencionar que estos anticuerpos, son inespecíficos para el diagnóstico de la EM ⁶.
- Potenciales evocados: son estudios basados en la inducción de un estímulo y se correlaciona con las características electrofisiológicas de la respuesta emitida por el paciente. Estos pueden ser dirigidos a las vías visual, auditiva y somatosensorial; dependiendo de los signos de los pacientes ³⁴. Si bien, son utilizados para evidenciar la presencia de lesiones silentes también proveen apoyo adicional en caso de que las anomalías sean diversas o menos específicas ³⁵.
- Imagen por Resonancia Magnética (IRM): es un estudio que da una mínima posibilidad de error, y provee evidencia de la distribución en tiempo y espacio de las lesiones detectadas ^{6, 7, 36, 37}.

Para realizar el diagnóstico de la EM se requiere al menos tres de las cuatro características siguientes:

- Una lesión observada con gadolinio o nueve hiperintensas en T2
(Figura 5).

Si las lesiones con gadolinio no están presentes entonces al menos debe existir:

- Una lesión infratentorial .
- Una lesión yuxtacortical .
- Tres lesiones periventriculares ^{38, 39} .

La IRM cerebral debe complementarse con la resonancia a nivel de médula espinal, ya que una lesión en esta región, puede ser sustituida por una lesión cerebral; además, si las lesiones cerebrales están ausentes, es necesario localizar dos o más lesiones en la médula espinal; haciendo así, más preciso el diagnóstico de la enfermedad ⁷ .

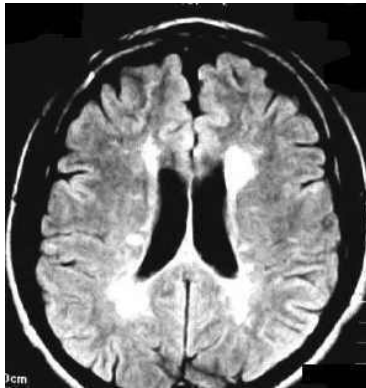


Figura 5. IRM cerebral con lesiones en sustancia blanca periventricular.
Disponibile en: <http://neurologia.rediris.es/congreso-1/posters/p-3.html>

1.7 FACTORES ASOCIADOS A LA PRESENTACIÓN DE LA EM.

Es preciso mencionar que la teoría actual acerca de la etiología, abarca la susceptibilidad genética en relación con la actividad de un agente infeccioso que juntos originen, desencadenen o induzcan exacerbaciones de la enfermedad ^{17, 40} .

- **Susceptibilidad genética para la presentación de EM.**

En la población de pacientes de origen mexicano diagnosticados con EM algunos antígenos leucocitarios humanos (HLA) más frecuentes son: DRB1, DQA1, DQB1, DR2, DR3, DR6, B7 y A3, siendo tanto DR2 como DR6 los que más se

presentan^{6, 41, 42, 43}. Al parecer, el ensamble de estas moléculas puede fallar resultando en una presentación inadecuada de antígenos¹² (**Figura 6**).

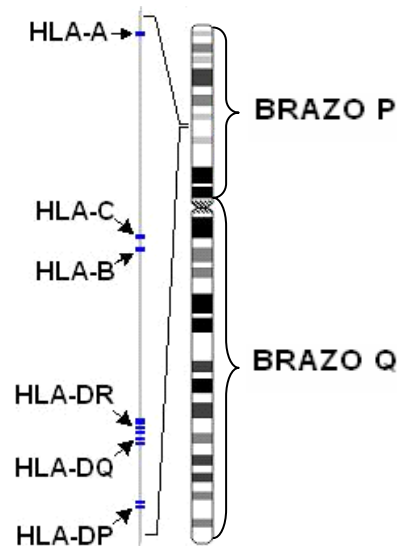


Figura 6. Ubicación del HLA en el cromosoma 6 humano. Tomada y modificada de: http://en.wikipedia.org/wiki/Image:HLA_complex1.JPG

Se han detectado grupos étnicos con mayor riesgo de presentación de EM, tal es el caso de habitantes europeos, lo que a su vez contrasta con habitantes de África, India, China, Japón y sureste de Asia quienes poseen un riesgo menor para presentarla. Este evento es atribuido en parte a los HLA vinculados a la probable exposición a agentes infecciosos^{44, 45, 46}.

Considerando importante la susceptibilidad genética, se han analizado árboles genealógicos de familias con miembros diagnosticados con EM, concluyendo que el riesgo para presentar la enfermedad es mayor para uno de los gemelos monocigóticos cuando el otro es diagnosticado con la enfermedad; a diferencia del riesgo entre gemelos dicigóticos, en quienes, el riesgo es similar al que existe entre hermanos no gemelos. Considerando lo anterior, se establecieron las diferentes relaciones de riesgo latente existentes de acuerdo al vínculo familiar⁴⁷, (**Cuadro 1**).

RIESGO LATENTE PARA PRESENTAR EM	RELACIÓN FAMILIAR
1:800	Población abierta
1:50	Hijo
1:20	Hermano
1:20	Gemelo dicigótico
1:3 a 1:4	Gemelo monocigótico

Cuadro 1 Riesgo de presentación de EM. Tomado y modificado de: Compston A, Kellar-Wood, Wood N. Multiple sclerosis. *Baill Clin Neurol.* 1994;3:353-371.

- **Microorganismos asociados con la presentación de la EM.**

Uno de los casos que vincularon a la EM con un agente infeccioso es el de las Islas Faroe, donde se anunció un brote considerado epidémico después de la Segunda Guerra Mundial, atribuido a la presencia de tropas militares británicas y a su posible relación con microorganismos con lo que tuvieron contacto ^{48, 49}.

La idea de que la etiología de la EM se relaciona con algún microorganismo, fue retomada por Kurtzke, quien hizo notar que la prevalencia de la enfermedad está dada de acuerdo a la disposición geográfica en que se habita. Por lo anterior Kurtzke, realiza estudios de migración, en los que concluye que el cambio de residencia de un área de alto riesgo a otra de bajo a una edad de 15 años o más, el riesgo se mantiene alto; de igual forma el riesgo puede ser adquirido cuando el cambio es de una zona de bajo hacia alto riesgo ⁵⁰.

La EM, puede ser el resultado de una enfermedad viral que posteriormente genere una respuesta inmunomediada ^{51, 52, 53}; ya que existen virus que pueden reactivarse después de un largo periodo de latencia, logrando desencadenar o exacerbar una patología desmielinizante aguda o subaguda ⁵⁴; tal como sucede en modelos animales y otras enfermedades en el humano ⁵⁵. Cabe mencionar que las exacerbaciones se han asociado con la presencia de infecciones entre las que destacan las del tracto respiratorio superior ^{56 57, 58}. Por otra parte, las enfermedades infecciosas en la niñez son más frecuentes en pacientes con EM

que en personas sanas, existiendo la posibilidad de que se mantenga latente la actividad de un microorganismo ⁵⁹.

Entre las bacterias que son consideradas como posibles factores asociados a la presentación o exacerbación de la EM, se encuentran: *Borrelia burgdorferi* ⁶⁰ y *Chlamydia pneumoniae* ⁶¹. Entre los agentes virales que se han relacionado con la desmielinización en la EM se pueden mencionar a los siguientes: virus herpes simple, virus herpes zóster, herpesvirus humano tipo 6 ^{62, 63}, virus de sarampión (VS) ^{64, 65}, rubéola, virus de la parotiditis (paperas) ⁶⁶, coronavirus ⁶⁷, retrovirus ^{68, 69}, virus Epstein-Barr ⁷⁰ y virus de moquillo canino ^{11, 71, 72, 73, 74, 75}.

ASOCIACIÓN ENTRE EL VMC Y LA EM

Los modelos animales para el estudio de la EM han sido diversos, entre ellos, ratas y ratones a los que se les induce encefalitis alérgica experimental generando una respuesta dependiente de linfocitos Th1 ⁷⁶. También, perros infectados con VMC se consideran propicios para el estudio de la EM dadas las similitudes con la enfermedad en humanos ^{77, 78}; ejemplo de ello es el estudio de la neuritis óptica, uveitis ⁷⁹ y desmielinización en regiones periventriculares que son evidentes tanto en lesiones histopatológicas como en IRM ⁸⁰. Por otra parte, es importante mencionar que es posible inducir la desmielinización experimental en monos mediante la inoculación de VMC, lo que representa un modelo más cercano al humano ^{81, 82}.

Algunos estudios epidemiológicos han asociado la EM con la exposición al VMC durante la adolescencia ya que algunos de ellos tuvieron perros infectados con este virus en este periodo de su vida, previo a la presentación de signos de EM ^{71, 72, 75, 83, 84, 85}. Aunado a ello, diversos estudios serológicos han detectado anticuerpos neutralizantes con títulos más elevados contra VMC en pacientes con EM a diferencia del grupo control ^{86, 87}. De manera más reciente se realizaron estudios de inmunohistoquímica en muestras de encéfalo de pacientes con EM utilizando anticuerpos monoclonales, los cuales reconocieron un epítipo conservado en la proteína de fusión de los Morbillivirus, sin determinar

propriadamente las condiciones del VMC⁸⁸. Otro de los aspectos que han propiciado la asociación del VMC con la EM es la presencia receptores β -2 adrenérgicos en las neuronas y ausencia de ellos en los astrocitos tanto en muestras de perros con encefalitis por VMC, como de pacientes con EM. Además de que los astrocitos en ambos pacientes, expresan el complejo principal de histocompatibilidad tipo II¹¹.

1.8 CARACTERÍSTICAS DEL VIRUS DE MOQUILLO CANINO

El virus de moquillo canino (VMC) es un virus envuelto que posee un solo filamento de ARN de sentido negativo y la simetría de su nucleocápside es helicoidal. Pertenece a la familia *Paramyxoviridae*, subfamilia *Paramyxovirinae* y género *Morbillivirus*⁸⁹. Algunas características desarrolladas por la infección con Paramixovirus son la formación de sincitios y lisis celular^{90, 91, 92, 93}.

La unión y penetración del VMC comienza cuando entra en contacto la Hemaglutinina (H) del virus, con los receptores de la membrana plasmática del huésped. Posteriormente la proteína de Fusión (F) actúa, generando la fusión de la envoltura del VMC con la membrana plasmática de la célula huésped y libera el material genético viral al citoplasma^{94, 95, 96}. Es conveniente aclarar que tanto la proteína H como la F, son parte integral de la envoltura viral (**Ver figura 7**)^{97, 98} y entre los receptores que ocupa, específicamente la proteína H, se encuentran los siguientes:

- Molécula de señalización de activación de linfocitos (SLAM): la cual es una glicoproteína de membrana expresada en las células del sistema inmune (timocitos inmaduros, células dendríticas maduras, linfocitos y monocitos activados). Según algunos autores, la SLAM es el receptor principal para la unión y replicación del VMC⁹⁹ y el VS¹⁰⁰. La unión de esta molécula con las células huésped podría explicar el linfotropismo e inmunosupresión natural de los Morbillivirus. ya que aún se desconoce si participa en la activación linfocitaria y en el control de la producción de interferón¹⁰¹. Entre otros aspectos, se considera que el VS, el VMC y el virus de

rinderpest podrían utilizar SLAM's de diferentes especies; aunque, su eficiencia podría ser reducida ¹⁰².

- CD46: es una proteína de la membrana, miembro de la familia de los reguladores de la activación del complemento que tiene como función prevenir la deposición de C3b y C4b en las células, protegiéndolas de la lisis ⁹⁹. Este receptor para el VMC y el VS se ha localizado en todos los tejidos humanos, con excepción de los eritrocitos; sin embargo, los primates no humanos, si lo presentan ¹⁰⁰.

Una vez que se libera el material genético viral, la replicación (duplicación del material genético) tiene lugar, exclusivamente en el citoplasma de neuronas, células de la glía y en tejido linfoide ^{103 104}. Actividad en la cual participa la nucleoproteína (NP) y la proteína grande (L); **(Figura 7)**. La primera sirve de molde para la replicación y la segunda proteína cataliza la síntesis del genoma. Además la NP es la proteína viral más abundante en células infectadas y viriones. Otra proteína que tiene un papel central en la síntesis del ARN viral, ya que forma parte del complejo de la polimerasa al igual que la NP y la proteína L, es la Fosfoproteína (P), la cual es una proteína altamente conservada entre los Morbillivirus y funciona como proteína chaperona al unir a la NP y a la proteína L ⁹⁰.

De manera casi inmediata a la replicación, se da la transcripción; en la que participa la proteína L y la P; en un inicio para rediseñar la nucleocápside y además para unirse al extremo 3' del ARN genómico con la finalidad de producir un ARNm de sentido positivo, complementario al ARN viral. La secuencia guía 3' del ARN, provee el punto de entrada para la ARN polimerasa dependiente de ARN. Dando como resultado un ARN monocistrónico unido al extremo 5' y con el extremo 3' poliadenilado por el complejo de la polimerasa. Posteriormente se detiene la polimerasa y se reinicia la síntesis de ARNm de cada gen hasta completar la longitud del genoma. Las subsecuentes síntesis de cadenas de

sentido negativo y positivo dependerán de la disponibilidad de la NP. Además, la traducción de los transcritos primarios, permite la acumulación de las proteínas virales y funciona como interruptor de la transcripción⁹⁰.

Posteriormente se ensambla la partícula viral con ayuda de la NP y la proteína Matriz (M), esta última, es una proteína asociada a la envoltura viral, que por su característica hidrofóbica, se encuentra en las superficies internas de las envolturas lipídicas del virión⁹⁰. Dentro de las funciones atribuidas a esta proteína, se encuentra el ensamblaje viral y la diseminación del mismo; sin embargo, los procedimientos que sigue para llevar a cabo sus funciones no están claramente determinados. Se conoce que la expresión restringida o nula de las proteínas M y F pueden ocasionar bajos niveles de antígeno viral, lo que facilita la persistencia tanto del VMC como del VS siendo la panencefalitis esclerosante subaguda una infección persistente ocasionada por este último virus^{105, 106, 107, 108}.

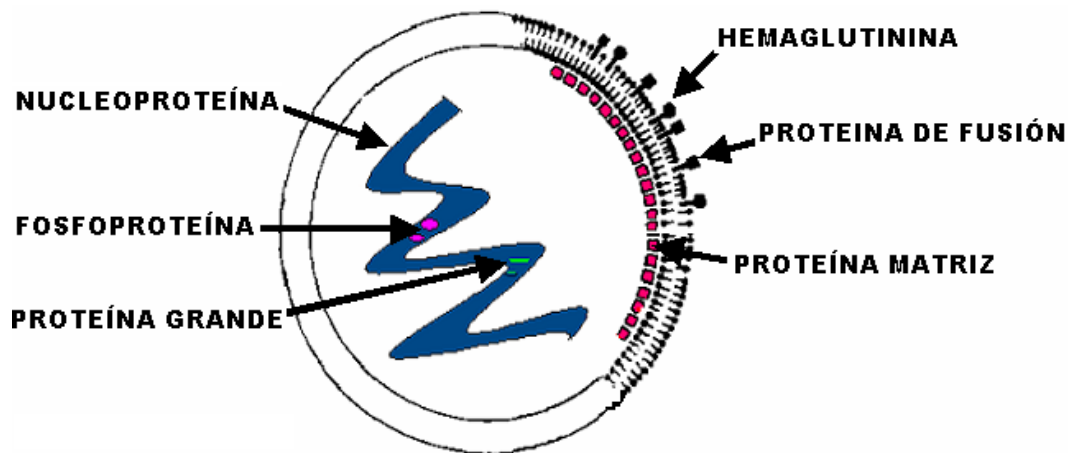


Figura 7. Esquematización de la estructura del VMC. Tomada y modificada de: Greene CE. Enfermedades infecciosas en perros y gatos. México: McGraw-Hill Interamericana. 2ª ed. 2000.

1.9 REFERENCIA HISTÓRICA DEL MOQUILLO CANINO

Durante el siglo XVII, Heusinger atribuyó el origen de la llegada del moquillo canino a España, debido al traslado de perros que provenían de Perú y es en 1763 cuando Webster informa sobre la muerte de 900 perros, en un sólo día en la ciudad de Madrid. Esto posterior a las observaciones de Ulloa, quien en 1746 describió al moquillo canino como una enfermedad común en América del sur, en su trabajo titulado *Relación histórica del viage a la América meridional*. Las investigaciones respecto a la enfermedad se fueron ampliando y hacia 1844 Karle lleva a cabo, la primera transmisión experimental de la enfermedad, colocando descargas de perros infectados, en los labios de perros jóvenes; siendo hasta 1881 cuando Kraiewsky reprodujo la enfermedad, por simple cohabitación ¹⁰⁹. Posteriormente, en 1905, Carré demostró que la enfermedad es causada por un virus y no el arsénico como lo pensaba Raspail en 1854 y es en 1993 cuando Sidhu *et al*, reportaron la secuencia completa del VMC ¹¹⁰.

Es preciso comentar que desde 1959, se observó una relación antigénica entre el VMC y VS, debido a la similitud entre la forma crónica del moquillo canino y la panencefalitis esclerosante subaguda causada por una infección con VS en humanos ^{111, 112}. Sin embargo, es hasta la década de los 80's cuando se confirmó la existencia de antigenicidad cruzada entre los anticuerpos dirigidos contra VS y VMC ^{113, 114, 115}.

1.10 CARACTERÍSTICAS GENERALES DEL MOQUILLO CANINO

El moquillo canino, (distemper canino o enfermedad de Carré) es una enfermedad viral multisistémica que fue descrita por primera vez en perros ^{116, 117}. Tiene una amplia variedad de huéspedes entre los que se encuentran los siguientes: cánidos (perros, zorros, coyotes, lobos), mustélidos (hurones, martas, minks, mofetas, tejones) ¹¹⁸, prociónidos (mapaches, coatíes), ailúridos (pandas menores y gigantes), úrsidos (osos), félicos (leones, tigres, leopardos) ^{119, 120}, mamíferos marinos ¹²¹ y además se menciona el caso de un mono infectado en forma natural que desarrolló encefalitis ⁸¹.

La enfermedad afecta principalmente a cachorros que han perdido su inmunidad pasiva, no se han vacunado y se han expuesto a animales infectados con VMC; sin embargo, animales adultos con inmunosupresión también son blanco de infección por el virus. Cabe mencionar que la forma en que se transmite el VMC, es mediante el contacto con exudado respiratorio de animales infectados con el virus, el cual es diseminado a través de aerosol o gotas. El virus puede excretarse durante 60 a 90 días postinfección y la eliminación del virus sucede en todas las excreciones del cuerpo, aun en infecciones subclínicas ¹²².

1.11 PATOGENIA DEL MOQUILLO CANINO

Hacia el día 0 (día de la infección), el virus se disemina por medio de aerosol y entra en contacto con las vías respiratorias. En las siguientes 24 horas, el virus se multiplica en macrófagos tisulares y se disemina hacia nódulos linfáticos locales como amígdalas y nódulos bronquiales. Alrededor de 2 a 4 días postinfección, el número de partículas virales aumenta en los nódulos linfáticos. Posteriormente del día 4 al día 6, el virus se multiplica en el bazo, lámina propia del estómago y del intestino delgado, nódulos linfáticos mesentéricos y células de Kupffer. Consecutivamente la viremia se hace evidente alrededor del día 7 al 9 y el virus comienza a ser eliminado, incluso en perros sin signos clínicos. En algunos casos la enfermedad sintomática se hace evidente alrededor del día 14 post-infección y además puede cursar de manera concomitante con otras infecciones ¹²².

Dado que la respuesta inmune es diferente en los individuos, se consideran tres posibles vías a seguir, después del día 14 postinfección:

- Si existe un nivel adecuado de anticuerpos y de citotoxicidad mediada por células, el virus es eliminado, los pacientes no muestran signos de enfermedad ¹²² y presentan anticuerpos contra las glicoproteínas de superficie viral H y F ¹²³.
- En casos donde la respuesta inmunitaria es deficiente, el virus se disemina hacia la mayoría de los tejidos, los signos son graves y el virus persiste en los tejidos hasta la muerte ¹²².

- En perros con niveles intermedios de respuesta inmune, el virus puede diseminarse a los tejidos epiteliales; permaneciendo de manera prolongada en tejido uveal, neuronas y cojinetes plantares ¹²², además de estar predispuestos a una enfermedad crónica de la sustancia blanca (mielina)¹²⁴.

Finalmente la recuperación es acompañada por un proceso de inmunidad prolongada y el cese de la eliminación del virus; sin embargo, pueden permanecer algunas secuelas neurológicas como ataxia, temblores y mioclonos si la infección se llevo al cabo con cepas no citolíticas; favoreciendo así, la persistencia viral en el SNC ^{122, 125, 126, 127}. Además, es preciso considerar que la patogenia de la enfermedad está dada principalmente por los siguientes factores:

- Infección de células huésped por VMC.
- Respuesta inmune dirigida hacia las células infectadas por el virus.
- Reacciones inmunomediadas hacia elementos del SNC ^{128, 129}.

El virus entra al SNC a través de la barrera hematoencefálica utilizando plaquetas, linfocitos y macrófagos como transportadores; aunado a la presencia de citocinas que incrementan la permeabilidad de dicha barrera, como son: IL-6, IL-1 β y TNF α ¹²³; logrando así, que el virus se distribuya a través del LCR debido a la infección temprana del plexo coroideo ^{130, 131}. Lo que explica la distribución de las lesiones hacia áreas subependimales como la corteza cerebral, nervios ópticos, velo bulbar anterior, pedúnculos cerebelosos y medula espinal ¹²². Una vez que el virus se encuentra dentro del SNC, puede replicar también en células gliales ¹³⁰. La invasión hacia el parénquima indica una diseminación hematógica del virus, siendo el plexo coroideo y los vasos sanguíneos cerebrales, las principales vías de neuroinvasión de los Morbillivirus; sin embargo, se ha propuesto otra vía que considera al bulbo olfatorio como una puerta de entrada, ya que es el primer lugar del SNC donde se localiza el virus al igual que en las células epiteliales de la mucosa nasal. La detección de células mitrales infectadas hacia el día 21 post-

infección indica que el virus es transmitido al cruzar la sinapsis neuronal, teniendo así el potencial de diseminarse hacia estructuras más profundas del SNC ^{131, 132}.

En los pacientes caninos, las placas desmielinizantes se localizan alrededor de la tercera semana postinfección y por su similitud con la esclerosis múltiple en el humano, el perro ha sido modelo de estudio al inducirles la desmielinización con cepas de VMC ^{133, 134, 135}; existiendo además similitudes en las lesiones histopatológicas entre ambas enfermedades ⁸⁰. La desmielinización en lesiones agudas, al parecer se relaciona con la infección viral de los macrófagos y de astrocitos más que de oligodendrocitos, los cuales muestran resistencia a la infección por VMC ^{136, 137} y es posible que en etapas tardías de la enfermedad, la principal causa de desmielinización continua y diseminada ⁸⁰ sea un por medio de *bystander activation* ¹³⁸.

1.12 SIGNOS CLÍNICOS DEL MOQUILLO CANINO

Los signos neurológicos dependen de la localización de las lesiones en el SNC ¹³⁹ entre los que se encuentran: indiferencia, deshidratación, disminución del apetito, emaciación, aumento de tamaño de los nódulos linfáticos, fiebre; hipoplasia del esmalte, vómito, diarrea en ocasiones con sangre y moco, tenesmo; queratoconjuntivitis, coriorretinitis y uveitis; anosmia, rinitis mucopurulenta, tos seca que en poco tiempo se convierte en productiva, disnea con incremento en los ruidos respiratorios inferiores; impétigo, hiperqueratosis nasal y digital; epididimitis y orquitis. Además, si la infección ocurre de forma transplacentaria se pueden producir abortos y nacimiento de cachorros débiles, además de sufrir inmunodeficiencias permanentes ^{140, 141}. También pueden presentarse convulsiones parciales que semejan la forma de mascar chicle, que sucede en casos de poliencefalomalacia de los lóbulos temporales, convulsiones generalizadas, mioclonos, ataxia cerebelar, tetraparesis o tetraplejia (espástica o flácida), paraparesia o paraplejia, déficit de propiocepción, y desorientación; de forma menos frecuente puede existir rigidez cervical por la inflamación meníngea, hiperestesia, neuritis óptica que se caracteriza por ceguera súbita con pupilas

dilatadas ^{122, 138}. Los perros infectados con VMC pueden presentar signos neurológicos al recuperarse de la enfermedad sistémica o incluso sin enfermedad previa aparente ^{122, 137}.

1.13 LESIONES DEL MOQUILLO CANINO

Las lesiones sistémicas que se pueden encontrar son las siguientes: intususcepciones, infección de vías respiratorias superiores, inflamación del árbol traquebronquial, neumonía intersticial difusa, sistema urinario tumefacto, cardiomiopatía, osteodistrofia hipertrófica y artritis en perros adultos ¹³⁷.

Las lesiones y el curso de la infección en el SNC dependen de la edad, capacidad inmunitaria del huésped, propiedades de la cepa viral y el momento en que se examinan las lesiones ¹²². En cuanto a la distribución de las lesiones, estas pueden ser focales, multifocales y difusas teniendo como localización principal: hemisferios cerebrales, tallo cerebral, cerebelo y médula espinal, siendo este el orden más frecuente de localización ^{104, 137}.

1.14 DIAGNOSTICO DEL MOQUILLO CANINO

Entre las pruebas utilizadas para el diagnóstico de la enfermedad se encuentran diferentes técnicas como:

- Aislamiento viral: aunque se considera idóneo aislar el virus, no es frecuente como una forma de diagnóstico debido a la dificultad en la adaptación de las cepas virales para replicar en las líneas celulares ¹²².
- Histopatología: se encuentran cuerpos de inclusión en leucocitos, células conjuntivales, neuronas y células de la glía. Las células infectadas son detectadas predominantemente en espacios periventriculares del SNC, el plexo coroideo y el epéndimo ¹⁴². Los cuerpos de inclusión indican sitios de replicación del virus; sin embargo, la ausencia de estos sitios no implica que el virus no esté presente en el animal. Lo cual puede dar resultados falsos

negativos además de que estas lesiones son observadas postmortem, lo cual impide su uso con fines de diagnóstico oportuno ^{122, 143, 144}.

- ELISA: la detección de anticuerpos por sí misma no es suficiente para el diagnóstico ya que hay perros infectados de forma aguda que mueren sin presentar anticuerpos y los infectados de forma subaguda y crónica presentan niveles de anticuerpos comparables con los vacunados. En ese caso se utiliza la prueba de ELISA para detección de IgM, la cual puede ser detectada desde 5 semanas a 3 meses después de la infección, dependiendo de la respuesta del huésped. En perros vacunados los títulos de IgM persisten sólo por dos semanas ¹²⁴.
- Hematología. respecto a los hallazgos en los estudios clínicos, se encuentran datos hematológicos anormales que incluyen linfopenia absoluta causada por agotamiento linfoide, trombocitopenia y anemia regenerativa ^{137, 138}. En cuanto al análisis de las proteínas totales, existe disminución de la albúmina, además de presentarse aumento en la concentración de alfa y gama globulinas en neonatos y recién nacidos. No obstante, deben correlacionarse con otros estudios ya que por sí mismos, no representan marcadores específicos de moquillo canino ¹²².
- Análisis de LCR: puede detectarse un aumento en la concentración de proteínas y células mononucleares, lo que indica una ruptura en la barrera hematoencefálica; sin embargo, no demuestra la presencia del VMC ^{140, 141}, además de que se producen resultados falsos negativos, ya que el líquido fluye con mayor rapidez de lo normal durante la obtención, por el aumento de presión intracraneana ¹²².
- Inmunofluorescencia. En perros afectados clínicamente se realiza esta técnica en frotis citológicos de tejido amigdalino y respiratorio, siendo más común el conjuntival y los frotis sanguíneos. En casos crónicos, esta

técnica no proporciona datos, ya que el recubrimiento del antígeno viral con anticuerpo interfiere con la inmunofluorescencia diagnóstica ¹²².

- Transcripción Reversa –Reacción en Cadena de la Polimerasa. (RT-PCR). La RT-PCR es una técnica que permite identificar el ácido nucleico de las estructuras de los microorganismos, en este caso del VMC. En esta técnica las moléculas de ARN sirven como molde para sintetizar ácido desoxirribonucleico complementario (ADNc), con el uso de una enzima denominada transcriptasa reversa. Este proceso se continúa con la amplificación de un fragmento determinado haciendo uso de iniciadores específicos y de Taq polimerasa, entre otros reactivos. Todo ello, con la finalidad de obtener un número de copias del fragmento buscado. Posteriormente la reacción debe ser visualizada en un gel de agarosa para determinar si estuvo presente o no, el producto amplificado esperado. La RT-PCR es una técnica que permite obtener resultados específicos con una amplia diversidad de muestras clínicas ¹⁴⁵.

1.15 TERAPÉUTICA

La terapia puede ser diversa tanto por la presentación de los signos clínicos, como por las características propias de cada individuo. De cualquier manera, es recomendable un tratamiento con antibióticos de amplio espectro como ampicilina o amoxicilina con una dosis de 20 mg/kg ya sea vía oral o intravenosa, con un intervalo de 8 horas y con una duración de 7 días. Además, se pueden utilizar expectorantes, nebulizaciones, antieméticos, soluciones parenterales según el estado de hidratación del paciente. En el caso del control de la ceguera y dilatación pupilar causadas por la neuritis óptica o en algunos signos relacionados con la forma crónica de encefalitis la terapéutica con glucocorticoides a dosis antiinflamatorias tienen un éxito variable. Respecto a las convulsiones, el tratamiento difiere según el paciente; sin embargo, entre los medicamentos que se puede utilizar se encuentra: fenobarbital, diacepam, bromuro de potasio y en caso de edema del SNC se recomienda dexametasona. Cuando los signos nerviosos

son incompatibles con la vida, es preferible recurrir a la eutanasia; como es el caso de la encefalitis multifocal progresiva que se manifiesta por tetraplejia, semicoma e incapacidad considerable ¹²².

-
- 1.-Murray TJ. Multiple sclerosis. The history of a disease. EUA:Demos, 2005.
 - 2.-Putnam T J. Evidence of vascular occlusion in multiple sclerosis and "encephalomyelitis". Arch Neurol Psychiatry 1937;1298-1321.
 - 3.-SwankRL. Multiple sclerosis: A correlation of its incidence with dietary fat. Am J Med Sci 1950;220:441-450.
 - 4.-Baker RWR, Thompson RHS, Zilkha KJ. Fatty acid composition of brain lecithins in multiple sclerosis. Lancet 1963;1:26-27.
 - 5.-Garcea-Correale. Vivir con esclerosis múltiple. Argentina: Médica Panamericana, 2003.
 - 6.-Núñez OL, editor. El manejo integral de los pacientes con Esclerosis Múltiple. México: Prado S.A de C.V. Asociación Médica Mexicana para el Estudio de la Esclerosis Múltiple. 2003.
 - 7.-Mc Donald WI, Compston A, Edan G, et al. Recommended Diagnostic Criteria for Multiple Sclerosis : Guidelines from the Internacional Panel on th Diagnosis of Multiple Sclerosis. Ann Neurol 2001;50:121-127.
 - 8.-Lublin FD, Reingold SC. Defining the clinical course of multiple sclerosis: results of an international survey. Neurology 1996;46:906-911.
 - 9.-Horwitz MS, Sarvetnick N. Viruses, host responses, and autoimmunity. Immunol Rev 1999;169:241–253.
 - 10.-Lucchinetti C, Brück W, Noseworthy JH. Multiple sclerosis: recent developments in neuropathology, pathogenesis , magnetic resonance imaging and treatment. Curr Opin Neurol 2001;14:259-269.
 - 11.-De Keyser, Jacques CA, Wilczak, et al. Disappearance of [beta]2-adrenergic receptors on astrocytes in canine distemper encephalitis: possible implications for the pathogenesis of multiple sclerosis. Neuroreport 2001;12(2):191-194.

-
- 12.-Pasantés H, Arias C, Massieu L, Zentella A, Tapia R. Enfermedades neurodegenerativas. Mecanismos celulares y moleculares. México: Fondo de Cultura Económica, 1999.
- 13.-Zipp F, Aktas O. The brain as a target of inflammation: common pathways link inflammatory and neurodegenerative diseases. *Trends in neurosciences* 2006;3(1):1-9.
- 14.-Yauch RL, Kim BS. A predominant viral epitope recognized by T cells from the periphery and demyelinating lesions of SJL/J mice infected with Theiler's virus is located within VP1(233-244). *J Immunol.* 1994;153:4508–4519.
- 15.-Kurtz CI, Sun XM, Fujinami RS. B-lymphocyte requirement for vaccine-mediated protection from Theiler's murine encephalomyelitis virus-induced central nervous system disease. *J Virol* 1995;69:5152–5155.
- 16.-Rodríguez M, Pavelko KD, Njenga MK, Logan WC, Wettstein PJ. The balance between persistent virus infection and immune cells determines demyelination. *J Immunol* 1996;157:5699–5709.
- 17.-Brahic M, Monteyne P. y Bureau J.F. Virus y esclerosis múltiple. Francia: Instituto Pasteur. Trad. Cuba J. M. y Díaz A. Unidad de Retrovirus y Prevención del SIDA, 1998.
- 18.-Piras MR, Magnano J, Canu ED, Paulus KS, Satta WM, Soddu A, et al. Longitudinal study of cognitive dysfunction in multiple sclerosis: neuropsychological, neuroradiological, and neurophysiological findings. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2003 Jul;74(7):878-85.
- 19.-Sailer M, Fischl B, Salat D, Tempelmann C, Schoenfeld MA. Focal thinning of the cerebral cortex in multiple sclerosis, *Brain* 2003;126:1734–1744.
- 20.-Inglese M, Ge Y, Filippi M, Falini A, Grossman RI, Gonen O. Indirect evidence for early widespread gray matter involvement in relapsing–remitting multiple sclerosis. *NeuroImage* 2004;21:1825–1829.
- 21.-Cook SD. Handbook of multiple sclerosis. 3ª ed. EUA: Marcel Dekker. 2001.
- 22.-Arnett HA, Mason J, Marino M, Suzuki K, Matsushima GK, Ting JP. TNF α promotes proliferaci3n de oligodendrocyte progenitors and remyelination. *Nature* 2001;4(11):1116-1122.

-
- 23.-Wujek JR, Bjartmar C, Richer E, Ransohoff RM, Yu M, Tuohy VK, Trapp BD. Axon loss in the spinal cord determines permanent neurological disability in an animal model of multiple sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2002;61:23–32.
- 24.-Grigoriadis N, Ben-Hur T, Karussis D, Milonas I. Axonal damage in multiple sclerosis: a complex issue in a complex disease. *Clin Neurol Neurosurg*. 2004;106:211–217.
- 25.-Grigoriadis N, Tselios T, Deraos S, Orogas A, Deraos G, Matsoukas J, Mavromatis I, Milonas I. Animal models of central nervous system immune-mediated diseases: therapeutic interventions with bioactive peptides and mimetics. *Curr Med Chem* 2005;12:1513–1519.
- 26.-Filippi M, Bozzali M, Rovaris M, Gonen O, Kesavadas C, Ghezzi A, Martinelli V, Grossman RI, Scotti G, Comi G, Falini A. Evidence for widespread axonal damage at the earliest clinical stage of multiple sclerosis. *Brain* 2003;126:433–437.
- 27.-McGavern DB, Murray PD, Rivera-Quinones C, Schmelzer JD, Low PA, Rodriguez M. Axonal loss results in spinal cord atrophy, electrophysiological abnormalities and neurological deficits following demyelination in a chronic inflammatory model of multiple sclerosis. *Brain* 2000;123(3):519–531.
- 28.-Ure D, Rodriguez M. Extensive injury of descending neurons demonstrated by retrograde labeling in a virus-induced murine model of chronic inflammatory demyelination. *J Neuropathol Exp Neurol* 2000;59:664–678.
- 29.-Sofroniew MV, Isacson O. Distribution of degeneration of cholinergic neurons in the septum following axotomy in different portions of the fimbria–fornix: a correlation between degree of cell loss and proximity of neuronal somata to the lesion, *J Chem Neuroanat* 1988;1:327–337.
- 30.-Corona T, Román GC. Multiple Sclerosis in Latin America. *Neuroepidemiology* 2006;26:1–3.
- ³¹ Corona T, editor. Esclerosis múltiple. México: Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Manuel Velasco Suárez. 2000.
- 32.-Andersson M, Alvarez-Cermeño J, Bernardi G, Cogato I, Fedman P, *et al*. Cerebrospinal fluid in the diagnosis of multiple sclerosis: a consensus report. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1994;57(8):897-902.

-
- 33.-Garren H, Steinman L, Lock C. The specificity of the antibody response in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 1998;43:4–6.
- 34.-Gronseth GA, Ashman EJ. Practice parameter: the usefulness of evoked potentials in identifying clinically silent lesions in patients with suspected multiple sclerosis. *Neurology* 2000;54:1720-1725.
- 35.-Pohl d, Rostasy K, Treiber-Held S, Brockmann K, Gärtner J, Hanefeld F. Pediatric multiple sclerosis: detection of clinically silent lesions by multimodal evoked potentials. *The journal of pediatrics* 2006;149(1):125-127.
- 36.-Fazekas F, Offenbacher H, Fuchs S, et al. Criteria for an increased especificity of MRI interpretation in ederly subjects with suspected multiple sclerosis. *Neurology* 1998.;38:1822-1825.
- 37.-Offenbacher H, Fazekas F, Schmidt R, et al. Assessment of MRI criteria for a diagnosis of MS. *Neurology* 1993;43:905-909.
- 38.-Barkhof F, Filippi M, Miller DH, et al . Comparision of MR imaging criteria at first presentation to predict conversion to clinically definite multiple slclerosis. *Brain* 1997;120:2059-2069.
- 39.-Tintoré M, Rovira A, Martínez M, et al. Isolated demyelinating syndromes: comparison of different MR imaging criteria to predict conversion to clinically definite multiple sclerosis. *Am J Neuroradiol* 2000;21:702-706.
- 40.-Ebers GC, Sadovnik AD, Risch NJ. A genetic basis for familial aggregation in multiple sclerosis. *Nature* 1995;377:150-151.
- 41.-Alález C, Corona T, Ruano L, Flores H, Loyola M, Gorodezky C. Mediterranean and Amerindian MHC class II alleles are associated with multiple sclerosis in Mexicans. *Acta Neurol Scand* 2005;112: 317–322.
- 42.-Alastair C. Genetic epidemiology of múltiple sclerosis. *Journal of neurology, neurosurgery and psychiatry* 1997;62.:553-561.
- 43.-Vella V.A review of the etiology of multiple sclerosis. *Ital J Neurol Sci.* 1984;5(4):347-56.
- 44.-Turgeon ML. Immunology and serology in laboratory medicine. 3a. ed EUA: Mosby, 2003.

-
- 45.-Compston A. The genetic epidemiology of multiple sclerosis. *Phil Trans R soc Lon B* 1999;354:1623-1634.
- 46.-Kurtzke JF. Epidemiologic contributions to multiple sclerosis: An overview. *Neurology* 1980;30(7 pt 2):61-79.
- 47.-Compston A, Kellar-Wood, Wood N. Multiple sclerosis. *Baill Clin Neurol*. 1994;3:353-371.
- 48.-Kurtzke JF, Hyllested K, Heltberg A. Multiple sclerosis in the Faroe Islands. The occurrence of the fourth epidemic as validation of transmission. *Acta Neurol Scand* 1993;88:161-173.
- 49.-Kurtzke JF, Hyllested K, Heltberg A. Multiple sclerosis in the Faroe Islands: transmission across four epidemics. *Acta Neurol Scand* 1995;91(5):321-325.
- 50.-Kurtzke JF. Epidemiologic Evidence for Multiple Sclerosis as an Infection. *Clin Microbiol Rev* 1993;6(4):382-427.
- 51.-Gilden DH. Infectious causes of multiple sclerosis. *Lancet Neurol* 2005;4:195–202.
- 52.-Roach ES. Is multiple sclerosis an autoimmune disorder? *Arch Neurol* 2004;61:1615–1616.
- 53.- Pryse-Phillips WE. The incidence and prevalence of multiple sclerosis in Newfoundland and Labrador, 1960-1984. *Ann Neurol* 1986;20(3):323-328.
- 54.-Buchmeier MJ, Lane TE. Viral-induced neurodegenerative disease. *Curr Opin Microbiol*. 1999;2:398–402.
- 55.-Grigoriadis N, Hadjigeorgiou GM. Virus-mediated autoimmunity in Multiple Sclerosis. *Autoimmune Dis* 2006;3:1.
- 56.-Kriesel JD, Sibley WA. The case for rhinoviruses in the pathogenesis of multiple sclerosis. *Mult Scler* 2005;11:1–4.
- 57.-Gilden DH. Multiple sclerosis exacerbations and infection. *Lancet Neurol* 2002;1:145.
- 58.-Buljevac D, Flach HZ, Hop WC, Hijdra D, Laman JD, Savelkoul HF, van Der Meche FG, van Doorn PA, Hintzen RQ. Prospective study on the relationship between infections and multiple sclerosis exacerbations. *Brain*. 2002;125:952–960

-
- 59.-Martyn CN. The epidemiology of multiple sclerosis. *Acta Neurol Scand Suppl* 1997;169:3-7.
- 60.-Bednarová J, Stourac P, Adam P. Relevance of immunological variables in neuroborreliosis and multiple sclerosis. *Acta Neurol Scand* 2005;112(2):97-102
- 61.-Sriram S, Yao SY, Stratton C, Calabresi P, Mitchell W, Ikejima H, Yamamoto Y. Comparative study of the presence of *Chlamydia pneumoniae* in cerebrospinal fluid of Patients with clinically definite and monosymptomatic multiple sclerosis. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2002;9(6):1332-1337.
- 62.-Duncan Clark. Human Herpesvirus Type 6 and Multiple Sclerosis. *Herpes* 2004;11(2).
- 63.-Challoner PB, Smith KT, Parker JD, MacLeod DL, Coulter SN, Rose TM, Schultz ER, Bennett JL, Garber RL, Chang M, et al. Plaque-associated expression of human herpesvirus 6 in multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995;92:7440–7444.
- 64.-Hela-Felicitas P, Reske D. Expansion of antibody reactivity in the cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients - follow-up and clinical implications. *Cerebrospinal Fluid Res* 2005;27;2:3.
- 65.-Field EJ, Cowshall S, Narang HK, Bell TM. Viruses in multiple sclerosis? *Lancet.* 1972;2:280–281.
- 66.-Atkins GJ, McQuaid S, Morris-Downes MM, Galbraith SE, Amor S, et al. Transient virus infection and multiple sclerosis. *Rev Med Virol* 2000;10(5):291-303.
- 67.-Yeh EA, Collins A, Cohen ME, Duffner PK, Faden H. Detection of coronavirus in the central nervous system of a child with acute disseminated encephalomyelitis. *Pediatrics* 2004;113(1 Pt 1):73-76.
- 68.-Clausen J. Endogenous retroviruses and MS: using ERVs as disease markers. *Int MS J* 2003;10(1):22-28.
- 69.-Perron H, Garson JA, Bedin F, Beseme F, Paranhos-Baccala G, Komurian-Pradel F, Mallet F, Tuke PW, Voisset C, Blond JL, Lalande B, Seigneurin JM, Mandrand B. Molecular identification of a novel retrovirus repeatedly isolated from patients with multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94:7583–7588.

-
- 70.-Ascherio A, Munger KL, Lennette ET, Spiegelman D, Hernan MA, Olek MJ, Hankinson SE, Hunter DJ. Epstein-Barr virus antibodies and risk of multiple sclerosis: a prospective study. *Jama*. 2001;286:3083–3088.
- 71.-Hernan MA, Zhang SM, Lipworth L, Olek MJ, Ascherio A. Multiple Sclerosis and Age at Infection with Common Viruses. *Epidemiology* 2001;12(3): 301-306.
- 72.-Norman JE Jr, Cook SD, Dowling PC. Household pets among veterans with multiple sclerosis and age-matched controls. Pilot survey. *Arch Neurol* 1983;40(4):213-214.
- 73.-Mititelu G, Bourceanu I. Multiple sclerosis and exposure to household dogs. *Preliminary Virologie* 1984;35(3):233-235.
- 74.-Rima BK, Duprex WP. Morbilliviruses and human disease. *J Pathol*. 2006;208(2):199-214.
- 75.-Cook SD, Dowling PC. A possible association between house pets and multiple sclerosis. *Lancet* 1977;1:980–982.
- 76.-Nagelkerken L. Role of Th1 and Th2 cells in autoimmune demyelination disease. *Braz J Med Biol Res*. 1998;31(1):55-60.
- 77.-Koestner A. Animal model of human disease: subacute sclerosing panencephalitis, multiple sclerosis; animal model: distemper-associated demyelinating encephalomyelitis. *Am J Pathol* 1975;78(2):361-364.
- 78.-Adams JM, Brown WJ, Snow HD, et al. Old dog encephalitis and demyelinating diseases in man. *Vet Pathol* 1975;12(3):220-226.
- 79.-Summers BA, Greisen HA, Appel MJ. Does virus persist in the uvea in multiple sclerosis, as in canine distemper encephalomyelitis? *Lancet*. 1983;13(2):372-5.
- 80.-Vandeveld M, Higgins RJ, Kristensen B, Kristensen F, Steck AJ, Kihm U. Demyelination in experimental canine distemper virus infection: immunological, pathologic, and immunohistological studies. *Acta Neuropathol* 1982;56:285-293.
- 81.-Ochikubo F, Nagata T, Yoshikawa Y, Matsubara Y, Kai C, Yamanouchi Y. Electroencephalogram and evoked potentials in the primate model of viral encephalitis. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 1993;88(5):397-407.

-
- 82.-Shishido A, Yamanouchi K. Encephalomyelitis induced by paramyxovirus in nonhuman primates with a special reference to possible viral etiology of multiple sclerosis. *Neurology* 1976;26(6 PT 2):83-84.
- 83.-Warren SA, Warren KG, Greenhill S, Paterson M. How multiple sclerosis is related to animal illness, stress and diabetes. *Can Med Assoc J.* 1982;126(4):377-382.
- 84.-Beltran I, Molto-Jorda JM, Díaz-Marín C, Martín R, Matías-Guiu J. Analytical epidemiological study of multiple sclerosis in Alcoi. *Rev Neurol* 1998;26(149):67-69.
- 85.-Thomas M, Robertson M. Multiple sclerosis in a Glasgow tenement. *Scott Med J.* 1984;29(4):244-6.
- 86.-Rohowsky KC, Dowling DC, Stuart D y Cook SD. Canine distemper virus-specific antibodies in multiple sclerosis. *Neurology* 1995;45:1554-1560.
- 87.-Cook SD, Rohowsky-Kochan C, Bansil S, Dowling PC. Evidence for multiple sclerosis as an infectious disease.. *Acta Neurol Scand Suppl* 1995;161:34-42.
- 88.-Geeraedts CA, Wilczak N, Van Binnendijk R, De Keyser J. Search for morbillivirus proteins in multiple sclerosis brain tissue. *SourceNeuroreport* 2004;15(1):27-32.
- 89.-International Committee on Taxonomy of Viruses. ICTV. Disponible en URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb>
- 90.-Collier L, Balows A y Sussman M. *Microbiology and Microbial Infections. Paramyxoviruses. Virology Vol. 1, 1998.*
- 91.-Smith Ca, Wood EJ. *Biología celular. México: Addison Wesley Longman, 1998*
- 92.-Smith Ca, Wood EJ. *Moléculas biológicas. México: Addison Wesley Longman, 1998*
- 93.-Messling VV, Zimmer G, Herrler G, Haas L, Cattaneo R. The hemagglutinin of canine distemper virus determines tropism and cytopathogenicity. *J Virol* 2001;75(14):6418-6427.
- 94.-Cherpillod P, Beck K, Zurbriggen A, Wittek R. Sequence analysis and expression of the attachment and fusion protein of canine distemper virus wild-type strain A75/17. *J Virol* 1999;73(3):2263-2269.

-
- 95.-Hass L, Liermann H, Harder TC, Barrett T, Löchelt M, Messling V et al. Analysis of the gene, the central untranslated region and the proximal coding part of the F gene of wild-type and vaccine canine distemper viruses. *Veterinary Microbiology* 1999;69:15-18.
- 96.-Wild TF, Naniche D, Rabourdin –Combe C, Gerlier D, Malvoisin E, et al. Mode of entry of morbilliviruses. *Veterinary Microbiology* 1999;44:267-270.
- 97.-Stern LB, Greenberg M, Gershoni JM, Rozenblatt S. The Hemagglutinin Envelope Protein of Canine Distemper Virus (CDV) Confers Cell Tropism as Illustrated by CDV and Measles Virus Complementation Analysis. *Journal of Virology* 1995;69(3):1661–1668.
- 98.-Barret T, Clarke SA, Evans, Rima BK. The nucleotide sequence of the gene encoding the F protein of the deduced amino acid sequence with other paramyxoviruses. *Virus Res* 1987;8:373-386.
- 99.-Tatsuo H, Yanagi Y. The morbillivirus receptor SLAM (CD150). *Microbiol Immunol* 2002;46(3):135-142.
- 100.-Yanagi Y, Takeda M, Ohno S, Seki F. Measles virus receptors and tropism. *J Infect Dis* 2006; 59:1-5.
- 101.-Galbraith SE, Tiwari A, Baron MD, Lund BT, Barret T, Cosby SL. Morbillivirus downregulation of CD46. *Journal of Virology* 1998;72(12): 10292-10297.
- 102.-Lan NT, Yamaguchi R, Uchida K, Sugano S, Tateyama S. Growth profiles of recent canine distemper isolates on vero cells expressing canine Signalling Lymphocyte Activation Molecule (SLAM). *J Comp Path* 2005; 133:77-81.
- 103.-Tipold A, Vandeveld M, Jaggy A. Neurological manifestations of canine distemper virus infection. *Journal of Small Animal Practice* 1992;33:466-470.
- 104.-Wise DJ, Carter GR. Viral Replication and Genetics. In: Carter G.R., Wise D.J. and Flores E.F. (Eds.), *A Concise Review of Veterinary Virology*. Ithaca: International Veterinary Information Service. 2005. Disponible en: www.ivis.org.
- 105.-Cathomen T, Mrkic D, Spehner R, Drillien R, et al. A matrix-less measles virus is infectious and elicits extensive cell fusion : consequences for propagation in the brain. *EMBO J* 1998:3899-3908.

-
- 106.-Zurbriggen a, Graber HU, Wagner A, Vandeveld M. Canine distemper virus persistence in the nervous system is associated with noncytolytic selective virus spread. *J Virol* 1995;69:1678-1686.
- 107.-Isaacson SH, Asher DM, Godec MS, Gibbs Jr CJ, Gajdusek DC. Widespread, restricted low-level measles virus infection of brain in a case of subacute sclerosing panencephalitis. *Acta Neuropathol* 1996;9:1-13.
- 108.-Billeter MA, Cattaneo R, Spielhofer P, Kaelin K, Huber M, Schmid A, et al. Generation and properties of measles virus mutations typically associated with subacute sclerosing panencephalitis. *Ann NY Acad Sci* 1994;724:367-377.
- 109.-Blancou J. History of the surveillance and control of transmissible animal diseases. Francia: Office International des Epizooties, 2003.
- 110.-Sidhu MS, Husar W, Cook SD, Dowling PC, Udem SA. Canine distemper terminal and intergenic non-protein coding nucleotide sequences: completion of the entire CDV genome sequence. *Virology* 1992;193(1):66-72.
- 111.-Millian S, Maisel JC, Kempe H, Plotkin S, Pagano J, Warren J. Antibody response of man to canine distemper virus. *Notes* 79:616-618.
- 112.-Johnson RT. Inflammatory and demyelinating disease. In: *Viral Infection of the Nervous System*. Raven Press, 1982.
- 113.-Cook SD, Dowling PC, Russell WC. Neutralizing antibodies to canine distemper and measles virus in multiple sclerosis. *J Neurol Sci* 1979;41(1):61-70.
- 114.-Madden DL, Wallen WC, Houff SA, Shekarchi IC, Leinikki PO, Castellano GA, Sever JL. Measles and canine distemper antibody. Presence in sera from patients with multiple sclerosis and matched control subjects. *Arch Neurol* 1981;38(1):13-15.
- 115.-Appel MJ, Glickman LT, Raine CS, Tourtellotte WW. Canine viruses and multiple sclerosis. *Neurology* 1981;31(8):944-949.
- 116.-Confer AW, Kahn DE, Koestner A, Krakowka S. Biological properties of a canine distemper virus isolate associated with demyelinating encephalomyelitis. *Infect Immun.* 1975;11(4):835-44.

-
- 117.-Appel MJ, Shek WR, Summers BA. Lymphocyte-mediated immune cytotoxicity in dogs infected with virulent canine distemper virus. *Infect Immun* 1982;37(2):592– 600.
- 118.-Mizak B, Rzezutka A. Application of N-PCR for diagnosis of distemper in dogs and fur animals. *Veterinary Microbiology* 2002;(88):95-103.
- 119.-Appel MJ, Yates RA, Foley GL, Bernstein JJ, Santinelli S, Spelman LH, Miller LD, Arp LH, Anderson M, Barr M, et al. Canine distemper epizootic in lions, tigers, and leopards in North America. *J Vet Diagn Invest* 1994;6(3):277-288.
- 120.-Roelke-Parker ME, Munson L, Packer C, Kock R, Cleaveland S, Carpenter M, O'Brien SJ, Pospischil A, Hofmann-Lehmann R, Lutz H, et al. A canine distemper virus epidemic in Serengeti lions (*Panthera leo*) *Nature* 1996;1;379;(6564):441-445.
- 121.-Saliki JT, Lehenbauer TW. Monoclonal Antibody-Based Competitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Detection of Morbillivirus Antibody in Marine Mammal Sera. *Clin Microbiol* 2001;39(5):1877–1881.
- 122.-Greene C. E. Enfermedades infecciosas en perros y gatos. 2^a ed México: McGraw-Hill Interamericana, 2000.
- 123.-Bollo E, Zurbriggen A, Vandeveld M, Fankhauser R. Canine distemper virus clearance in chronic inflammatory demyelination. *Acta Neuropathol* 1986;72:69-73.
- 124.-Griot-Wenk M, Griot C, Pfister H, Vandeveld M. Antibody-dependent cellular cytotoxicity in antimyelin antibody-induced oligodendrocyte damage in vitro. *J Neuroimmunol* 1991;33:145-155.
- 125.-Higgins RJ, Krakowa SG, Metzler AE, Koestner A. Primary demyelination in experimental canine distemper virus induced encephalomyelitis in gnotobiotics dogs. *Acta Neuropathologica*. 1982;58:1-8.
- 126.-Stettler M, Beck K, Wagner A, Vandeveld M, Zurbriggen A. Determinants of persistence in canine distemper viruses. *Veterinary Microbiology* 1996;57:83-93.
- 127.-Barret T. Morbillivirus infections, with special emphasis on morbilliviruses of carnivores. *Veterinary Microbiology* 1999;69:3-13.
- 128.-Zurbriggen A, Schmid I, Graber HM, Vandeveld M. Oligodendroglial pathology in canine distemper. *Acta Neuropathologica* 1998;95:71-77.

-
- 129.-Griot C, Burge T, Vandeveld M, Peterhans E. Bystander demyelination through antibody induced macrophage activation in canine distemper virus infection. *Schweizer Archiv für Neurologie und Psychiatrie* 1989;140:39-41.
- 130.-Appel MJG y Summers BA. *Canine Distemper: Current Status*. EUA: Institute of Animal Health, College of Veterinary Medicine, Cornell University, 1999.
- 131.- Rudd PA, Cattaneo R, Messling V. Canine distemper virus uses both the anterograde and the hematogenous pathway for neuroinvasion. *J Virol*. 2006;80(19):9361-9370.
- 132.-Van den P, Dalton P, Rose JK. Relative neurotropism of a recombinant rhabdovirus expressing a green fluorescent envelope glycoprotein. *J virol*. 2002;76:1309-1327.
- 133.-Koestner A. Animal model of human disease: subacute sclerosing panencephalitis, multiple sclerosis; animal model: distemper-associated demyelinating encephalomyelitis. *Am J Pathol* 1975;78(2):361-364.
- 134.-Adams JM, Brown WJ, Snow HD, et al. Old dog encephalitis and demyelinating diseases in man. *Vet Pathol* 1975;12(3):220-226.
- 135.-Ochikubo F, Nagata T, Yoshikawa Y, Matsubara Y, Kai C, Yamanouchi Y. Electroencephalogram and evoked potentials in the primate model of viral encephalitis. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 1993;88(5):397-407.
- 136.-Duffy PE. Functional implications of astrocyte metabolism. In: *Astocytes: Normal, Reactive and Neoplastic*. Raven Press. 1983 39-41.
- 137.-Thomas WB, Sorjonen DC, Streiss JE. A retrospective evaluation of 38 cases of canine distemper encephalomyelitis. *Journal of the American Animal Hospital Association*.1993;29:129-133.
- 138.-Vandeveld M, Zubriggen A, Higgins RJ, Palmer D. Spread and distribution of viral antigen in nervous canine distemper. *Acta Neuropathol* 1985;67-:211-218.
- 139.-Kirk R. W. *Terapéutica veterinaria en pequeños animales*. México: McGraw-Hill Interamericana, 1995.
- 140.-Quinn P. J., Carter M. T. et al. *Clinical Veterinary Microbiology*. España: Mosby. 2004.

-
- 141.-Koutinas AF, Polizopoulou, Baumgaertner, LekkasS, Kontos V. Relation of clinical signs to pathological changes in 19 cases of canine distemper encephalomyelitis. J Comp Path.2002;126:47-56
- 142.-Summer B, Cummings J, DeLahunta A. Canine distemper encephalomyelitis. Veterinary Pathology 1995:102-110.
- 143.-Castro E. A. y Heuschele W. P. Veterinary diagnostic virology. A practitioners's guide. EUA: Mosby Year Book, 1992.
- 144.-Johnson GC, Fenner WR, Krakowa S. Production of immunoglobulin G and increased antiviral antibody in cerebrospinal fluid of dogs lethally infected with delayed-onset canine distemper viral encephalitis. Journal of Neuroimmunology 1988;17:237-251.
- 145.-Farell RE. RNA methodologies. A laboratory guide for isolation and characterization. 2a. ed EUA:Academic Press, 1998

2. JUSTIFICACIÓN.

Con base en estudios previos, los cuales sugieren una asociación entre el VMC y la EM y en la certeza de que no existen estudios experimentales dirigidos a la identificación del VMC en pacientes con EM; se propone la aplicación de técnicas de biología molecular con el fin de localizar el ARN viral en leucocitos de pacientes con EM; en quienes se considera, que el virus puede desencadenar el mecanismo conocido como *bystander activation* en algunas personas con susceptibilidad a la EM.

3. HIPÓTESIS

El ARN del VMC será identificado en los leucocitos de pacientes con EM.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL.

Identificar el ARN del VMC en pacientes diagnosticados con EM mediante ensayos de RT-PCR, para determinar si el VMC puede estar presente en estas células.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

Estandarizar la técnica de RT-PCR mediante la utilización de cultivos celulares, infectados con VMC, muestras sanguíneas y encéfalos de perros positivos por inmunofluorescencia, para posteriormente utilizar la técnica con muestras sanguíneas de humano.

Realizar un escrutinio general de los tres grupos experimentales, mediante ensayos de RT-PCR de las muestras sanguíneas, para determinar la presencia del VMC en individuos con características diferentes.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 CEPAS DE REFERENCIA DE VMC.

La cepa de referencia de VMC utilizada fue la Onderstepoort ¹, la cual fue propagada en células vero ^a.

5.2 MUESTRAS PARA ESTANDARIZACIÓN DE LA RT-PCR.

Para corroborar la sensibilidad y especificidad de la técnica de RT-PCR fue necesario hacer ensayos previos con muestras de encéfalos y muestras sanguíneas de pacientes caninos diagnosticados previamente como positivos para VMC mediante inmunofluorescencia. Esta prueba fue realizada por el personal del Laboratorio de Virología del Departamento de Microbiología e Inmunología de la FVMZ-UNAM.

5.3 MUESTRAS EXPERIMENTALES.

El material biológico solicitado fueron muestras de 7 ml de sangre con anticoagulante ácido etilendiaminotetracético (EDTA) en tubo al vacío y fueron obtenidas por la MC Esp. en Neurología Sandra Quiñones Aguilar. Se mantuvieron en refrigeración hasta realizarse la extracción de ARN, tiempo que no fue mayor a 12 horas. El tipo de muestra fue elegido con base en ensayos previos realizados por otros autores, en los que realizaron RT-PCR en muestras sanguíneas de pacientes caninos para identificar VMC, obteniendo resultados satisfactorios respecto al uso de la técnica con este tipo de muestra ^{2, 3}.

Las muestras fueron clasificadas en tres grupos experimentales:

- **Pacientes diagnosticados con EM:** los criterios de inclusión que se establecieron para la toma de muestra fueron los siguientes: ser pacientes con EM clínicamente definida de acuerdo a los criterios de Mc Donald, con cualquier tipo de curso de la enfermedad ⁷, ambos sexos,

^a Holland de México S. A. de C. V

estar de acuerdo en donar su muestra y firmar el consentimiento informado (**Ver formato 1 en el Anexo**). Teniendo como único criterio de exclusión las enfermedades concomitantes severas. Las muestras fueron proporcionadas por 32 pacientes que asistieron a la reunión mensual de EMAC (Esclerosis Múltiple Asociación Civil), el día 27 de enero del año en curso; a quienes se les informó previamente del procedimiento que se llevó a cabo con su muestra; para lo cual otorgaron su consentimiento informado por escrito y además llenaron un cuestionario con el que se recabó información general (**Ver formato 2 en el Anexo**).

- **Personas sin enfermedades neurológicas, dedicadas a la clínica de pequeñas especies:** Se solicitaron 10 muestras de estudiantes de la FMVZ-UNAM.
- **Personas sin enfermedades neurológicas y que no han tenido mascotas caninas o hurones.** Se solicitaron 10 muestras del personal administrativo de la FMVZ-UNAM.

5.4 PREPARACIÓN DE CULTIVOS CELULARES COMO CONTROLES.

Previo a la realización de RT-PCR se realizó cultivo celular para obtener los controles necesarios para los ensayos.

- **Cultivo celular utilizado para la amplificación de un fragmento del gen de β -actina como control.**

El manejo de los cultivos celulares se realizó en campana de flujo laminar ^b y se utilizaron células HeLa, las cuales fueron crecidas en botellas de poliestireno ^c con área de cultivo de 25 cm². En MEM ^d al 5% de suero fetal bovino calificado ^e.

^b Nuair® Tipo II A/B3

Se decantó y retiró el excedente de MEM, posteriormente se realizó un lavado con 0.5 ml de tripsina 0.05% con EDTA ^f, se decantó y agregó de nuevo la misma cantidad.

Se colocó en incubadora ^g a 37°C por alrededor de 3 a 5 minutos como máximo, para desprender las células.

Se agregó 2.5 ml de MEM preparado y se trasladó 1 ml de la mezcla a cada botella (3 botellas en total).

A cada botella se agregó 8.5 ml de MEM preparado y 0.5 ml de suero fetal bovino calificado.

Se colocó en incubadora a 37°C con una concentración de 5% de CO₂ por alrededor de 3 días para alcanzar casi la totalidad de la confluencia.

Posteriormente los cultivos celulares fueron utilizados para extracción de ARN.

- **Cultivo celular utilizado para la amplificación de un fragmento del gen de la fosfoproteína del VMC como control.**

Para el control negativo de VMC se propagaron células vero de la misma forma que las células HeLa, exceptuando que el MEM no fue adicionado con glutamina y no se utilizó CO₂ en su incubación. Una vez que los cultivos alcanzaron su máxima confluencia, se les realizó extracción de ARN.

En el caso de la realización del control positivo se utilizaron células vero, las cuales fueron crecidas en botellas de poliestireno con área de cultivo de 25 cm², en MEM al 3% de suero fetal bovino calificado. Para lo cual se procedió de la siguiente forma:

^c Nunc®

^d Gibco Invitrogen®

^e Gibco Invitrogen®

^f Gibco Invitrogen®

^g Nuair®

Se decantó y retiró el excedente de MEM, posteriormente se llevó a cabo un lavado con 0.5 ml de tripsina 0.05% con EDTA, se decantó y agregó de nuevo la misma cantidad.

Se colocó en incubadora ^h a 37°C por alrededor de 3 a 5 minutos como máximo, para desprender las células.

Se agregó 2.5 ml de MEM preparado y se trasladó 1ml de la mezcla a cada botella (3 botellas en total).

A cada botella se le agregó 7.7 ml de MEM preparado y 0.3 ml de suero fetal bovino calificado.

Se homogenizaron y se agregó a cada botella 1 ml de la cepa de referencia Onderstepoort.

Se colocó en incubadora a 37°C por alrededor de 3 a 5 días.

Algunos sobrenadantes fueron conservados a -70°C en ultracongelador ⁱ para utilizarlos en reinfecciones posteriores y en otros casos los cultivos celulares fueron utilizados para extracción de ARN.

5.5 EXTRACCIÓN DE ARN.

Las extracciones de ARN se realizaron en campana de flujo laminar ^j.

- **Preparación y homogenización de la muestra.**
 - **Cultivo celular.** Se decantó el MEM y se realizaron 3 lavados con PBS solución amortiguadora de fosfatos (PBS) frío. Se retiró el excedente de buffer y se agregó 2.0 mL de Trizol Reagent ^k por cada cultivo celular de 25cm².

^h Fisher Sc ® Mod. 116885 LH

ⁱ Harris® Mod. DLS-1429OBDA

^j The Baker Company Sterilgard® Tipo II A/B3

^k Sigma®

- **Encéfalos.** Se adicionó 1 ml de Trizol Reagent a 100 mg de tejido y se homogenizó con micropipeta. Ocasionalmente fue necesario mezclar en el homogenizador ^l por alrededor de 1 minuto.
- **Muestras sanguíneas.** Se centrifugó cada muestra a 1500 G por 5 minutos ^m, se transfirieron 200 µl de la capa leucoplaquetaria con micropipeta a tubos con capacidad de 1.5 ml y posteriormente se agregaron 20 µl de ácido acético 5N además de 750 µl de Tri Reagent BD ⁿ. Una vez colocados los reactivos, se mezcló en el homogenizador.

- **Separación de las muestras.**

Las muestras fueron incubadas por 5 minutos a temperatura ambiente, posteriormente se agregaron 200 µl de cloroformo y se mezclaron vigorosamente con la mano por 15 segundos para después incubarse por 3 minutos a temperatura ambiente. Concluido lo anterior, se centrifugaron de forma refrigerada 12 000 G, 15 minutos, 4°C.

- **Precipitación del ARN.**

Los sobrenadantes fueron transferidos a tubos nuevos, a los que se les adicionó 500 µl de isopropanol y se mezclaron por inversión. Las muestras se incubaron a temperatura ambiente 10 minutos; posteriormente fueron centrifugadas a 12 000 G, 10 minutos, 4°C en el caso de cultivos celulares y encéfalos; las muestras sanguíneas sólo se centrifugaron 8 minutos. Cabe mencionar que las pastillas de ARN no siempre fueron visibles, debido a una baja concentración de ARN.

- **Lavado de ARN.**

Se decantaron los sobrenadantes y se adicionó 1 ml de etanol al 75% por cada muestra y posteriormente se centrifugaron a 7 500 G, 5 minutos, 4°C.

^l Lab-line Instruments Super- Mixer® Mod. 1290

^m Eppendorf® Mod. 5416

ⁿ Invitrogen®

- **Solubilización de ARN.**

Se decantaron las muestras y dejaron secar las pastillas aproximadamente 10 minutos. Posteriormente se resuspendieron con 10 a 30 µl de agua con DEPC, homogenizando varias veces con la micropipeta. Para después incubarse en baño María ° a 55-60°C por 10 minutos.

5.6 CUANTIFICACIÓN DE ARN.

Las muestras fueron cuantificadas por medio de espectrofotometría, con el propósito de realizar los ensayos a partir de concentraciones determinadas de ARN. Para ello se utilizó la siguiente fórmula de acuerdo a las indicaciones del fabricante ^P :

(Lectura de 260nm) (40 µg/ml) (Factor de dilución) = Concentración real del ARN.

5.7 ELABORACIÓN DE GELES DESNATURALIZANTES.

La elaboración de geles desnaturalizantes se realizó con el propósito de hacer evidentes las bandas 28S y 18S del ARN ribosomal y así determinar la integridad del mismo⁴.

- **Elaboración del gel.**

Para preparar 100 ml de gel se disolvieron 1.5 g de agarosa en 10 ml de MOPS 10X y 83 ml de agua con DEPC, en horno de microondas. Una vez que disminuyó un poco la temperatura de la mezcla, se agregó 7 ml de formol 37% 12.3 M, en la campana de extracción ^q. Posteriormente se mezcló y vació en la cámara de electroforesis ^r en la que previamente fueron colocados los peines.

Una vez solidificado el gel, se le agregaron 600 ml del amortiguador de corrida (MOPS 1x) y se le aplicaron 100 volts por 30 minutos con la fuente de poder ^s.

^o Precision Scientific® Mod 25

^p Pharmacia Biotech® Ultrospec 3000

^q Labconco Corporation®

^r Gibco BRL® Mod. 11*14

^s Bio-Rad ® Mod 1000/500

- **Preparación de las muestras.**

La cantidad de ARN se aproximó a 2 µg por muestra. La cantidad varió dependiendo la concentración de la muestra, desde 3 hasta 12 µl. Por lo que a cada una se le agregó la cantidad de mezcla para muestras de ARN necesaria, tomando en cuenta que la relación es 1:1. Posteriormente las muestras se incubaron en baño María a 55°C durante 10 minutos y el marcador de pares de bases 0.1-2 kb RNA Ladder ^t se incubó en baño María a 70°C, 10 minutos. Finalmente se aplicó un pulso en microcentrífuga ^u y se agregó el amortiguador de carga, aproximadamente de 3 a 5 µl por muestra.

- **Electroforesis de las muestras.**

Las muestras se incluyeron en el gel y se les aplicó 100 volts por 1 hora con la fuente de poder; para posteriormente teñirse en una solución de bromuro de etidio en agua con DEPC, por alrededor de 15 minutos. Una vez finalizada la tinción se utilizó el fotodocumentador ^v para obtener las imágenes de los geles.

5.8 TRANSCRIPCIÓN REVERSA.

Una vez cuantificado el ARN, revisada la integridad de la muestra y tratadas las muestras con DNasa, se procedió a realizar la transcripción reversa para obtener ADNc. Los ensayos fueron realizados con una cantidad de 500 ng de ARN por cada muestra clínica; la mitad del ADNc fue utilizado para la amplificación de un fragmento del gen de la β-actina y la otra para la amplificación de un fragmento del gen de la fosfoproteína del VMC.

Las muestras transcritas fueron: ARN de células vero infectadas con VMC (testigo positivo) y ARN de células vero sin infectar (testigo negativo) cuyo ADNc fue utilizado en los ensayos de PCR para la amplificación de productos de un fragmento del gen de la fosfoproteína del VMC; también se realizaron los transcritos de ARN de células HeLa (testigo positivo) y agua como testigo

^t Invitrogen®

^u Micromax IEC®

^v Gel logic 200 Kodak®

negativo para los ensayos de PCR para la posterior amplificación de un fragmento del gen de β -actina; además de ARN de todas las muestras experimentales que se incluyeron posteriormente en ambas PCR. Las mezclas de los reactivos fueron preparadas en campana de flujo laminar (**Cuadro 2**), el ciclo que se siguió fue el especificado en el **Cuadro 3** y se llevó a cabo en el termociclador ^w.

REACTIVO	LABORATORIO	CONCENTRACIÓN	μ l
Amortiguador de síntesis de primera cadena	Invitrogen®	5X	3.0
DTT	Invitrogen®	100 mM	1.0
dNPT	Gibco®	10 mM	1.5
MgCl ₂	Invitrogen®	50 mM	1.5
Transcriptasa reversa	SuperScript II Invitrogen®	200 U/ μ l	0.5
Inhibidor de RNasas	RNase OUT Invitrogen®	40 U/ μ l	0.4
Oligo dT 12-18	Gibco®	0.5 μ g/ μ l	2.0
ARN		500 ng	1-10
Agua estéril		Cbp 30 μ l	

Cuadro 2. Mezcla de reactivos para transcripción reversa. Se muestran los reactivos, laboratorios, concentraciones y cantidades utilizadas.

NOMBRE DEL CICLO	TEMPERATURA °C	TIEMPO	NÚMERO DE CICLOS
Transcripción Reversa	42	1h	1

Cuadro 3. Ciclo de la transcripción reversa. Se muestra el nombre del ciclo, la temperatura, el tiempo y el número de ciclos.

^w Techne® Mod. TC-512

5.9 PCR PARA AMPLIFICAR UN FRAGMENTO DEL GEN DE LA β -ACTINA.

Los iniciadores utilizados para amplificar un fragmento de 132 pb del gen constitutivo de β -actina fueron los realizados por Lin *et al*, de los cuales se especifica su secuencia en el **Cuadro 4**⁵. Los ensayos se realizaron a partir de ADNc de células HeLa (testigo positivo), ADNc de las muestras experimentales y se incluyó una reacción con agua como testigo negativo. Las mezclas de los reactivos fueron preparadas en campana de flujo laminar y su composición se encuentra especificada en el **Cuadro 5**.

SENTIDO	No. PARES DE BASES	SECUENCIA DEL INICIADOR
SENTIDO	23 pb	5' TCATGAAGTGTGACGTGGACATC 3'
ANTISENTIDO	24 pb	5' CAGGAGGAGCAATGATCTTGATCT 3'

Cuadro 4. Iniciadores para amplificar un fragmento del gen de la β -actina. Se muestran los dos iniciadores con sus respectivos números de pares de bases y secuencias.

REACTIVO	LABORATORIO	CONCENTRACIÓN	μ l
Amortiguador para PCR	Invitrogen®	10X	3.5
MgCl ₂	Invitrogen®	50 mM	1.5
Taq polimerasa	Taq polimerasa recombinante Invitrogen®	2 U/ μ l	1.0
Iniciador sentido	Invitrogen®	10 μ M	1.0
Iniciador antisentido	Invitrogen®	10 μ M	1.0
ADNc			15
Agua estéril			12

Cuadro 5. Mezcla de reactivos para amplificar un fragmento del gen de la β -actina mediante PCR. Se muestran los reactivos, laboratorios, concentraciones y cantidades utilizadas.

Una vez preparadas las reacciones, se colocaron en el termociclador, donde se llevaron a cabo los ciclos necesarios para la amplificación de los productos. Los ciclos de la técnica fueron determinados con base en los datos utilizados por Lin *et al*¹³⁹ en combinación con las estimadas por el programa de cómputo DNAMAN©⁶ y revisada en diferentes secuencias reportadas en el Genbank⁷. Además se consideraron los parámetros de función de las enzimas Transcriptasa reversa y de la Taq polimerasa recombinante para su amplificación. Los ciclos utilizados se presentan en el **Cuadro 6** y son esquematizados en la **Figura 8**.

NOMBRE DEL CICLO	TEMPERATURA	TIEMPO	NÚMERO DE CICLOS
Cambios de temp.	Variaciones	Variaciones	
Inicio de la PCR	50	2.0 m	1
Desnat. Inicial	95	10 m	40
Desnaturalización	95	15 s	
Alineamiento	60	1.0 m	
Extensión inicial	72	1.5 m	1
Extensión	72	10 m	1

Cuadro 6. Ciclos de la PCR para amplificar un fragmento del gen de la β -actina. Se muestra el nombre del ciclo, la temperatura, el tiempo y el número de ciclos.

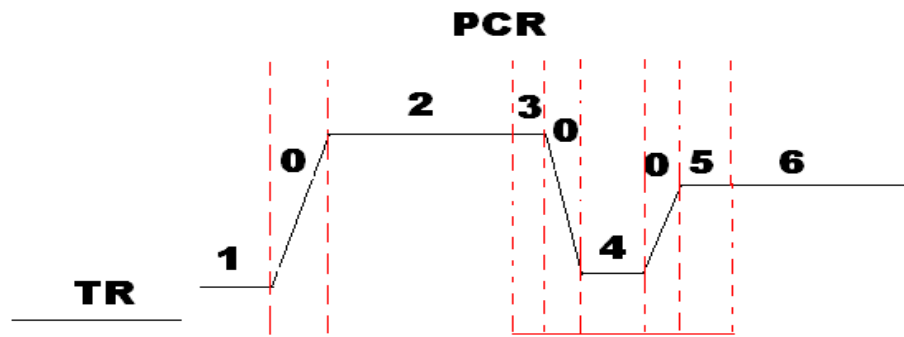


Figura 8. Esquematación de los ciclos de RT-PCR para amplificar un fragmento del gen de la β -actina . En los que TR es la transcripción reversa, PCR es la reacción en cadena de la polimerasa, 0 son las variaciones de temperatura, 1 es el inicio de la PCR, 2 desnaturalización inicial, 3 desnaturalización, 4 alineamiento, 5 extensión inicial y 6 extensión. Los pasos 3, 4 y 5 se repiten 40 ciclos.

5.10 PCR PARA AMPLIFICAR UN FRAGMENTO DEL GEN DE LA FOSFOPROTEÍNA DEL VMC.

El fragmento del gen que se amplificó está constituido por 696 pb del gen de la fosfoproteína del VMC, con base en la persistencia de regiones conservadas entre las distintas cepas del VMC¹⁵². Los iniciadores de la PCR que se utilizaron fueron los estandarizados por Coria GEM, de los cuales se muestra su secuencia en el **Cuadro 7**⁸. Los ensayos de PCR para amplificar un fragmento del gen de la fosfoproteína del VMC se realizaron a partir de ADNc de células vero infectadas con VMC (testigo positivo), ADNc de las muestras experimentales y ADNc de células vero sin infectar (testigo negativo); dichas muestras se mezclaron con los reactivos necesarios, tal como se presenta en el **Cuadro 8**.

SENTIDO	No.PARES DE BASES	SECUENCIA DEL INICIADOR
SENTIDO	22 pb	5' GAAGAGCAGGCCTATCATGTCA3'
ANTISENTIDO	23 pb	5' CTCTCCTGTGCCCTTTTAAATGG 3'

Cuadro 7. Iniciadores para amplificar un fragmento del gen de la fosfoproteína del VMC. Se muestran los dos iniciadores con sus respectivos números de pares de bases y secuencias.

REACTIVO	LABORATORIO	CONCENTRACIÓN	µl
Amortiguador para PCR	Invitrogen®	10X	3.5
MgCl ₂	Invitrogen®	50 mM	1.5
Taq polimerasa	Taq polimerasa recombinante Invitrogen®	2 U/µl	1.0
Iniciador sentido	Invitrogen®	25 ng/µl	1.0
Iniciador antisentido	Invitrogen®	25 ng/µl	1.0
ADNc			15
Agua estéril			12

Cuadro 8. Mezcla de reactivos para amplificar un fragmento del gen de la fosfoproteína del VMC mediante PCR. Se muestran los reactivos, laboratorios, concentraciones y cantidades utilizadas.

Las reacciones se colocaron en el termociclador donde se llevaron a cabo los ciclos necesarios para la amplificación de los productos. Los ciclos de la técnica fueron los estandarizados por Coria GEM¹⁵³; los cuales se presentan en el **Cuadro 9** y son esquematizados en la **Figura 9**.

CICLO	NOMBRE DEL CICLO	TEMPERATURA °C	TIEMPO	NÚMERO DE CICLOS
0	Cambios de temp.	Variaciones	Variaciones	1
1	Desnat. Inicial	94	1.5 m	35
2	Alineamiento	56	2.0 m	
3	Extensión inicial	72	1.5 m	
4	Extensión	72	7.0 m	1

Cuadro 9. Ciclos de la PCR para amplificar un fragmento de 696 pb del gen de la fosfoproteína del VMC. Se muestra el nombre del ciclo, la temperatura, el tiempo y el número de ciclos.

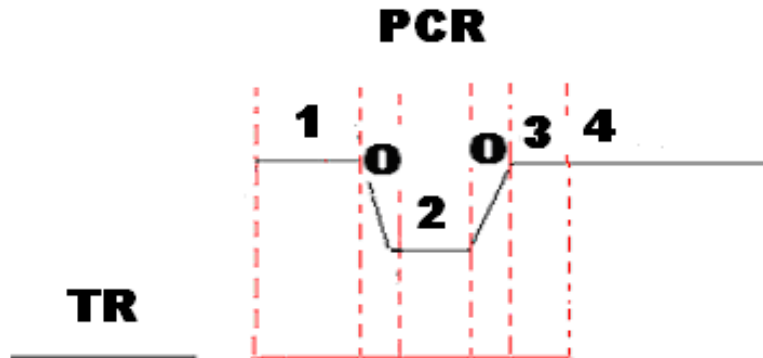


Figura 9. Esquematización de los ciclos de RT-PCR para amplificar un fragmento del gen de la fosfoproteína del VMC. Donde TR representa a la transcripción reversa, PCR es la reacción en cadena de la polimerasa; 0 son las variaciones de temperatura, 1 es la desnaturalización inicial, 2 alineamiento, 3 extensión inicial y 4 extensión. Los pasos 1, 2 y 3 se repiten 35 ciclos.

5.11 VISUALIZACIÓN DE LOS PRODUCTOS AMPLIFICADOS MEDIANTE RT- PCR.

Para hacer evidente el producto amplificado mediante RT-PCR, fue necesaria la electroforesis de las muestras; por lo cual, se realizaron geles de agarosa al 2% en TAE para los productos amplificados de un fragmento del gen de β -actina y al 1% en TAE para los productos amplificados a partir de un fragmento del gen de la fosfoproteína del VMC. Las muestras se incluyeron en el gel y se les aplicó 80 volts por 45 minutos con la fuente de poder. Posteriormente los geles se tiñeron en una solución de bromuro de etidio de 10 $\mu\text{g/ml}$ en agua destilada y se sumergieron en el gel por alrededor de 15 minutos. Una vez finalizada la tinción Se utilizó el fotodocumentador para obtener las imágenes de los geles.

-
- 1.-Lan NT, Yamaguchi R, Kai K, et al. The Growth Profiles of Three Types of Canine Distemper Virus on Vero Cells Expressing Canine Signaling Lymphocyte Activation Molecule. *J Vet Med Sci* 2005;67(5):491-495.
 - 2.-Rzezutka A, Mizak B. Application of N-PCR for diagnosis of distemper in dogs and fur animals. *Veterinary Microbiology* 88;(2002)95-103.
 - 3.-Frisk AL, Köning 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* 1999;37(11):3634-3643.
 - 4.-Ausbel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, et al editores. *Currents Protocols in Molecular Biology*. EUA: Wiley, 2001.
 - 5.-Lin P, Hu SW, Chang TH. Correlation between Gene Expression of Aryl Hydrocarbon Receptor (AhR), Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator (Arnt), Cytochromes P4501A1 (CYP1A1) and 1B1 (CYP1B1), and Inducibility of CYP1A1 and CYP1B1 in Human Lymphocytes. *Toxicological Sciences* 2003;71:20–26.
 - 6.-Lynnon Biosoft. DNAMAN (programa de cómputo) versión 3.0 Universidad Nacional Autónoma de México, 1994.
 - 7.-National Center for Biotechnology Information. Genbank. Disponible en URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/Blast.cgi>
 - 8.-Coria GE. Utilización de RT-PCR, ELISA y cultivo celular para detectar la presencia del virus de distemper en lobos marinos de California en Sonora (tesis de licenciatura). México D.F.: FMVZ- UNAM, 2005.

6. RESULTADOS

6.1 INFORMACIÓN DE LOS PACIENTES

Respecto a la información recabada mediante los cuestionarios aplicados a los pacientes con EM, se tiene la siguiente información:

El **71.87%** de los pacientes muestreados fueron mujeres y el **28.12%** hombres, lo que permite obtener una relación aproximada de **2.5 mujeres: 1 hombre**.

Las edades de los pacientes oscilaron entre los **15** y **65** años de edad, teniendo como edad promedio **43.2** años. Observándose en la gráfica un mayor número de pacientes con edades entre los 42 a 50 años de edad (**Figura 10**).

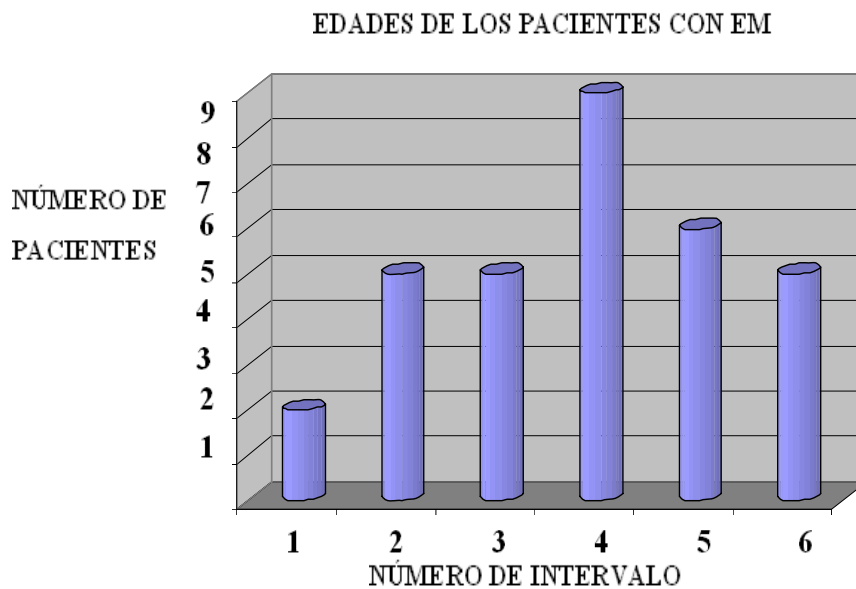


Figura 10. Gráfica de las edades de los pacientes con EM que donaron muestras. Se presenta el número de intervalo seguido del número de pacientes y rango de edad. Intervalo 1 con 2 pacientes de 15 a 23 años; intervalo 2 con 5 pacientes de 24 a 32 años; intervalo 3 con 5 pacientes de 33 a 41 años; intervalo 4 con 9 pacientes de 42 a 50 años; intervalo 5 con 6 pacientes de 51 a 59 años e intervalo 6 con 5 pacientes de 60 a 68 años.

El **68.75 %** afirmó no tener familiares con enfermedades neurológicas, el **28.125%** de los pacientes sí los tiene y el **3.125%** no tiene conocimiento de ello.

El **53.125%** de los pacientes muestreados ha presentado infección con virus de sarampión, el **34.375%** no ha tenido infección aparente y el **12.5%** no tiene conocimiento al respecto.

El **78.125%** tiene o ha tenido como mascota a un perro, el **12.5%** no ha tenido mascotas y el **9.375%** tiene otras especies animales como tortugas, gatos y aves.

De los pacientes que han tenido como mascota un perro, el **74.07%** afirma que sus perros fueron vacunados, el **11.111%** no lo están y el **14.814 %** no lo sabe.

El **51.851 %** de los pacientes mantienen a sus perros en el patio, el **33.333%** lo tiene dentro de casa, el **7.407%** tiene a sus perros en ambos lugares, el **3.703%** lo tiene en la azotea y el **3.703%** lo mantiene en el patio y la azotea.

El **77.777%** de los perros tiene contacto con hurones o perros ajenos a los de casa y el **22.222%** no tienen contacto con otros.

6.2 ESTANDARIZACIÓN DE LA RT-PCR.

Con la finalidad de estandarizar la técnica de RT-PCR se realizaron extracciones de ARN de encéfalos, muestras sanguíneas y células infectadas, a partir de las cuales se realizó la RT-PCR en un solo paso con base en los parámetros establecidos por Coria GE ¹⁵³. Con base en ello, se determinó que la técnica puede ser utilizada en estas muestras sin necesidad de colocar reactivos optimizadores de la PCR. Los productos amplificados mediante ensayos de RT-PCR son presentados en la **Figura 11**.

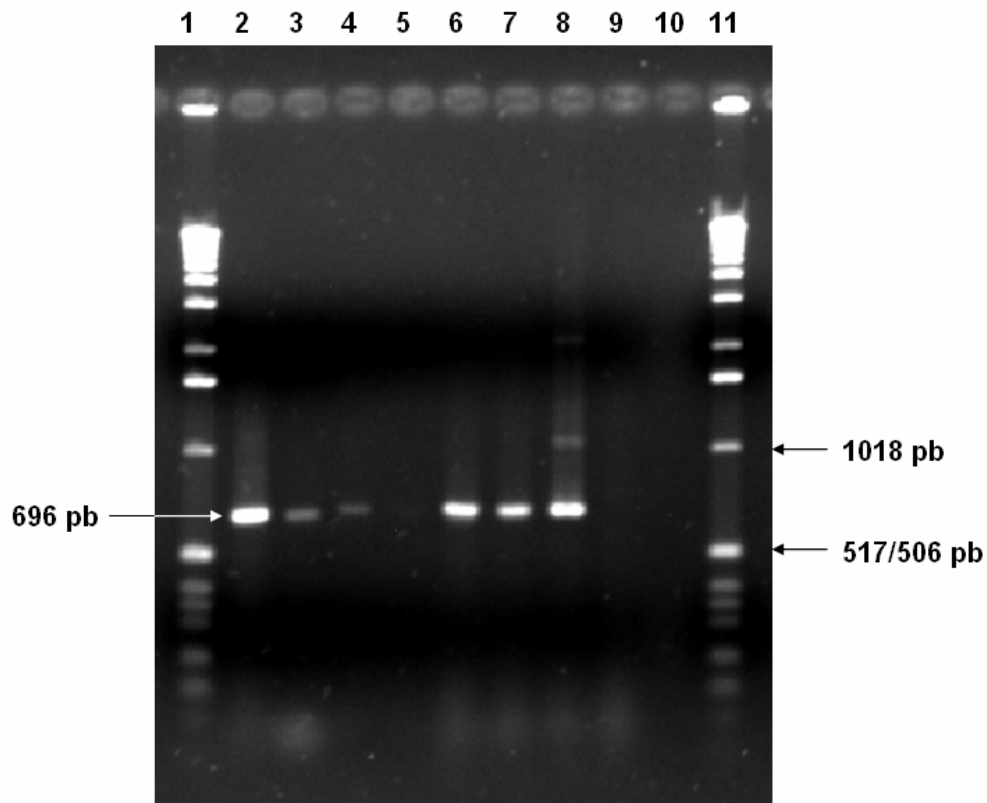


Figura 11. Productos de 696 pb del gen de la fosfoproteína del VMC amplificados mediante RT-PCR.

Gel de agarosa al 1% en TAE. En los carriles 1 y 11 se muestran los marcadores 1kb DNA Ladder. De los carriles 2 al 10 se observan productos amplificados de diferentes muestras: carril 2 células vero infectadas con VMC cepa Onderstepoort; carril 3 encéfalo 1; carril 4 encéfalo 2; carril 5 células vero sin infectar; carril 6 encéfalo 106; carril 7 leucocitos 080207; carril 8 leucocitos 200906; carril 9 células vero sin infectar; carril 10 agua.

6.3 DETERMINACIÓN DE LA CANTIDAD MÍNIMA DE ARN CON VMC DETECTABLE MEDIANTE RT-PCR

En la **Figura 12** se pueden observar los productos amplificados a partir de un encéfalo previamente diagnosticado como positivo de VMC mediante inmunofluorescencia y RT-PCR. A partir de esta muestra de encéfalo se realizaron diluciones dobles seriadas del ARN obtenido, con la finalidad de conocer el límite mínimo de detección del VMC. El producto amplificado es visible a partir de la dilución que contiene 5 ng de ARN; aunque es posible observarlo mejor con 20 ng.

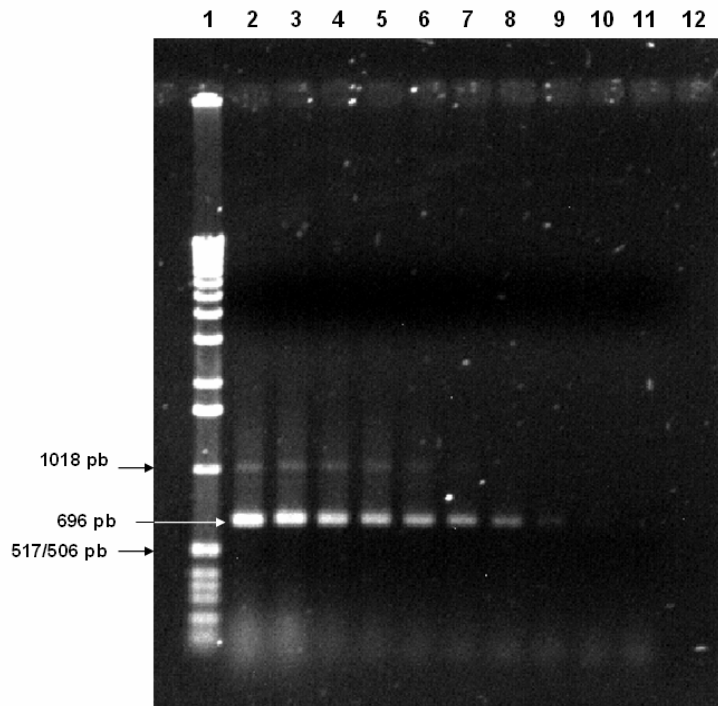


Figura 12. Productos de 696 pb del gen de la fosfoproteína del VMC amplificados mediante RT-PCR. Diluciones de ARN del encéfalo 106.

Gel de agarosa al 1% en TAE. En el carril 1 se muestra el marcador 1 kb DNA Ladder. De los carriles 2 al 10 se observan productos amplificados de diferentes diluciones: carril 2 dilución 1/4 (640 ng); carril 3 dilución 1/8 (320 ng); carril 4 dilución 1/16 (160 ng); carril 5 dilución 1/32 (80 ng); carril 6 dilución 1/64 (40 ng); carril 7 dilución 1/128 (20 ng); carril 8 dilución 1/256 (10 ng); carril 9 dilución 1/512 (5 ng); carril 10 dilución 1/1024 (2.5 ng); carril 11 agua.

6.4 AMPLIFICACIÓN DE UN FRAGMENTO DEL GEN DE β -ACTINA MEDIANTE RT-PCR

En la **Figura 13** se presentan productos amplificados de un fragmento del gen de β -actina humana utilizado como control en la RT-PCR de las muestras sanguíneas. El fragmento del gen amplificado se obtuvo a partir de células HeLa y de leucocitos humanos.

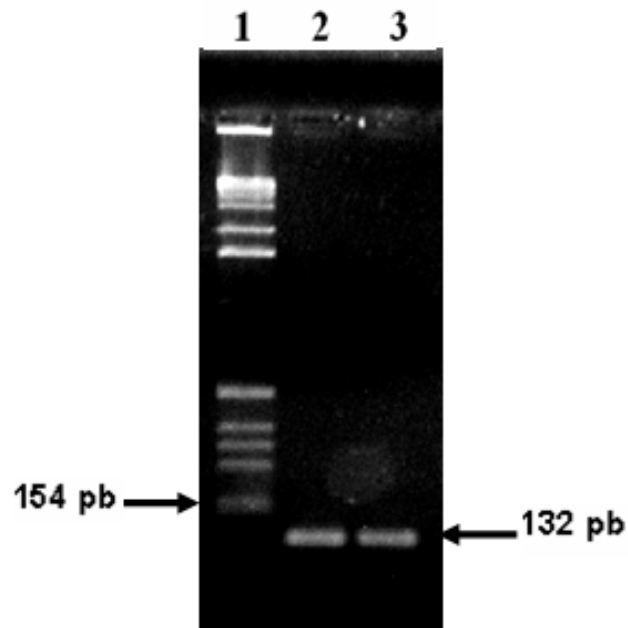


Figura 13. Productos amplificados de un fragmento del gen de β -actina mediante RT-PCR

Gel de agarosa al 2% en TAE, en donde se muestran productos amplificados de un fragmento del gen de β -actina. En el carril 1 se encuentra el marcador 1 kb DNA Ladder. En los carriles 2 y 3 se encuentran los productos amplificados de células HeLa y de leucocitos, respectivamente.

6.5 DETERMINACIÓN DE LA CANTIDAD MÍNIMA DE ARN DETECTABLE MEDIANTE RT-PCR DE UN FRAGMENTO DEL GEN DE β -ACTINA

Se realizaron diluciones dobles seriadas de ARN extraído a partir de células HeLa con la finalidad de detectar las cantidades mínimas para lograr amplificar un fragmento del gen de β -actina humana. En la **Figura 14** se observa con poca definición desde una concentración de 2.1 ng; sin embargo, con 17 ng se visualiza mejor el producto amplificado.

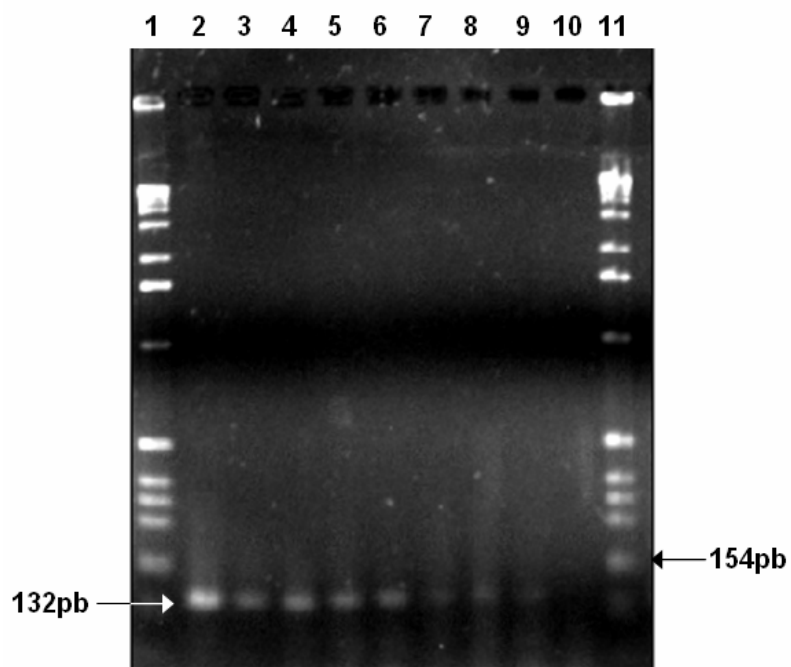


Figura 14. Productos amplificados a partir de un fragmento del gen de β -actina mediante RT-PCR. Diluciones de ARN de células HeLa.

Gel de agarosa al 2% en TAE. En los carriles 1 y 11 se muestra el marcador 1 kb DNA Ladder. De los carriles 2 al 10 se observan los productos amplificados de diferentes diluciones: carril 2 dilución 1/4 (273 ng); carril 3 dilución 1/8 (136.62 ng); carril 4 dilución 1/16 (68.31 ng); carril 5 dilución 1/32 (34.15 ng); carril 6 dilución 1/64 (17.07 ng); carril 7 dilución 1/128 (8.53 ng); carril 8 dilución 1/256 (4.26 ng); carril 9 dilución 1/512 (2.1ng); carril 10 agua.

6.6 EXTRACCIÓN DE ARN A PARTIR DE MUESTRAS EXPERIMENTALES

Se realizaron las extracciones de ARN de las muestras sanguíneas experimentales y se lograron visualizar las bandas 28 S y 18 S del ARN ribosomal de aproximadamente 5 y 2 kb respectivamente; lo cual indica integridad del ARN ¹³⁴. (Figuras 15-19).

En las Figuras 15 y 16 se observan las extracciones de ARN de las muestras sanguíneas de personas sin enfermedades neurológicas, mientras que en las Figuras 17 y 18 se presentan dos ejemplos de geles con extracciones de ARN de las muestras sanguíneas de los pacientes con EM.

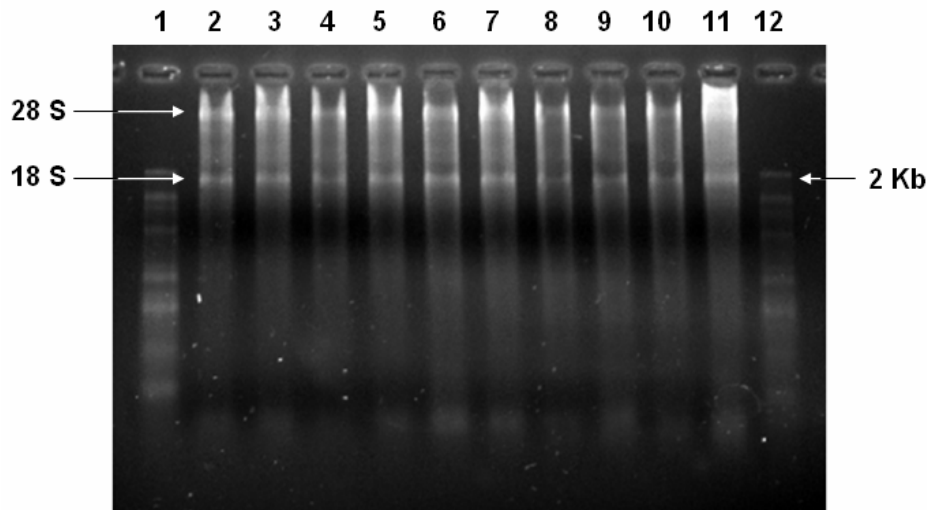


Figura 15. ARN total de muestras de personas dedicadas a la clínica de pequeñas especies.

Gel desnaturalizante al 1.5% en agua con DEPC y con formaldehído. En los carriles 1 y 12 se muestra el marcador 0.1-2 kb RNA Ladder. De los carriles 2 al 11 se observan de manera consecutiva las muestras de ARN.

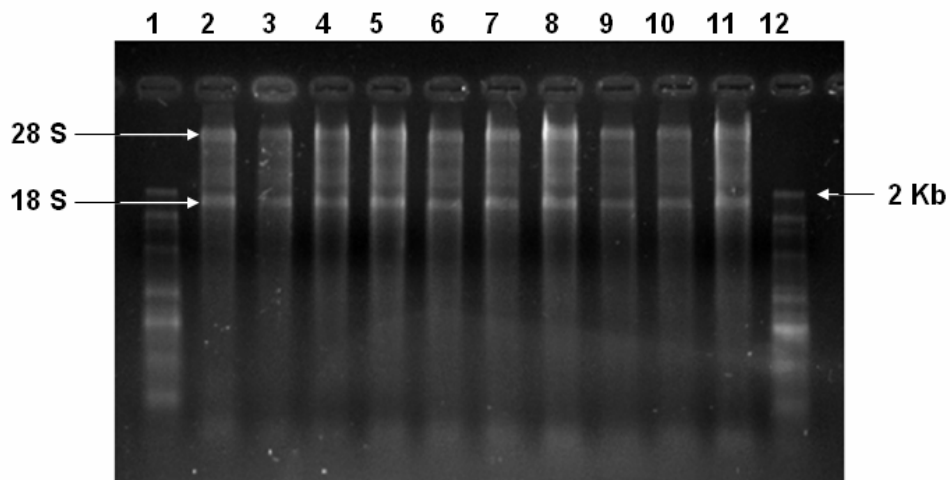


Figura 16. ARN total de muestras de personas que no han tenido perros o hurones como mascotas.

Gel desnaturizante al 1.5% en agua con DEPC y con formaldehído. En el carril 1 y 12 se muestra el marcador 0.1-2 kb RNA Ladder. Del carril 2 al 11 se observan de manera consecutiva las muestras de ARN.

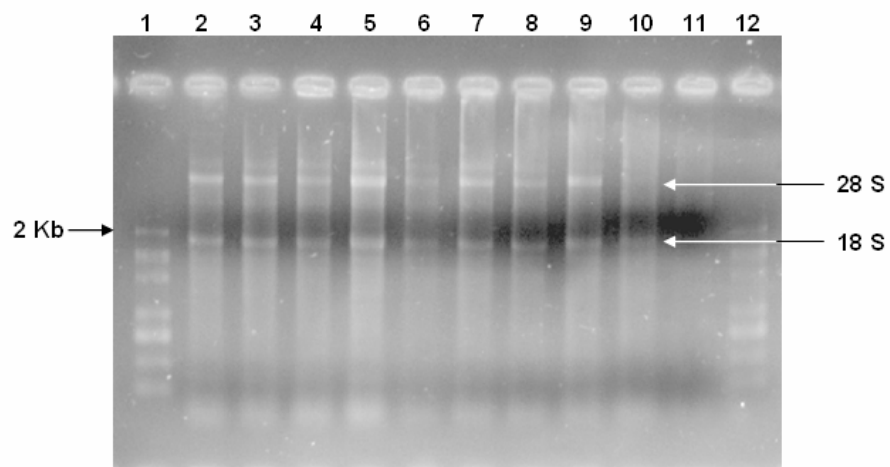


Figura 17

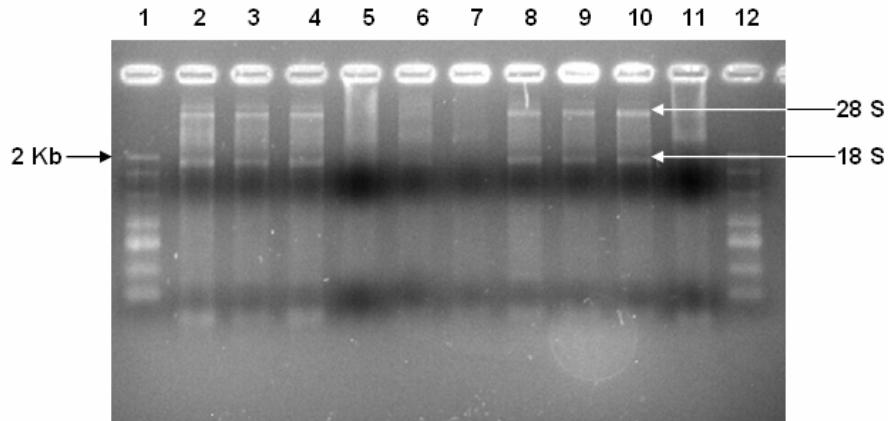


Figura 18

Figuras 17 y 18. ARN total de muestras de pacientes con EM.

Ambas figuras son geles desnaturizantes al 1.5% en agua con DEPC y formaldehído. En los carriles 1 y 12 se muestra el marcador 0.1-2 kb RNA Ladder. En los carriles 2 al 11 se observan de manera consecutiva las muestras de ARN.

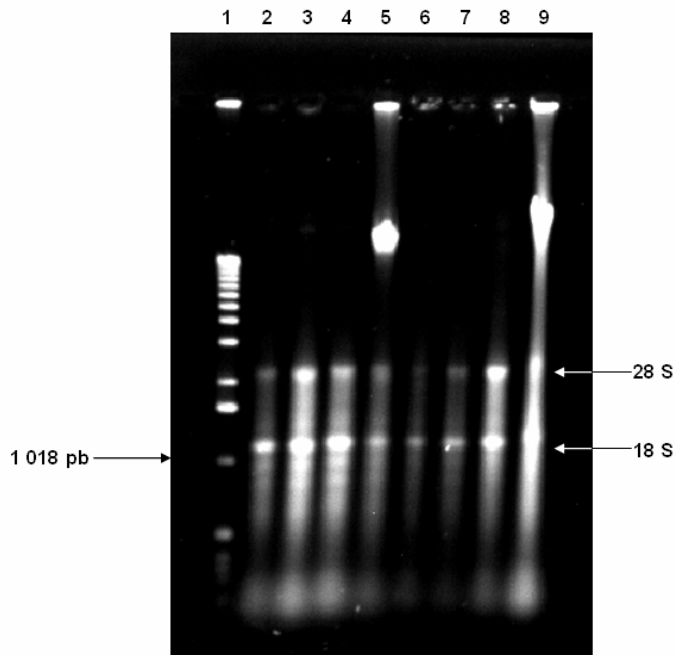


Figura 19. ARN total de muestras de pacientes con EM.

Gel de agarosa al 1% en TAE. En el carril 1 se muestra el marcador 1 kb DNA Ladder. En los carriles 2 al 9 se observan de manera consecutiva las muestras de ARN. Las muestras de los carriles 5 y 9 se encuentran contaminadas con ADN. Los pesos de las bandas de ARN no corresponden a los reales por no encontrarse en un gel desnaturizante.

6.7 AMPLIFICACIÓN DE UN FRAGMENTO DEL GEN DE β -ACTINA HUMANA A PARTIR DE LAS MUESTRAS SANGUÍNEAS EXPERIMENTALES

Se realizó la RT-PCR en dos pasos para la amplificación de un fragmento del gen de β -actina con todas las muestras experimentales. En la **Figura 20** se muestra un gel como ejemplo de las amplificaciones.

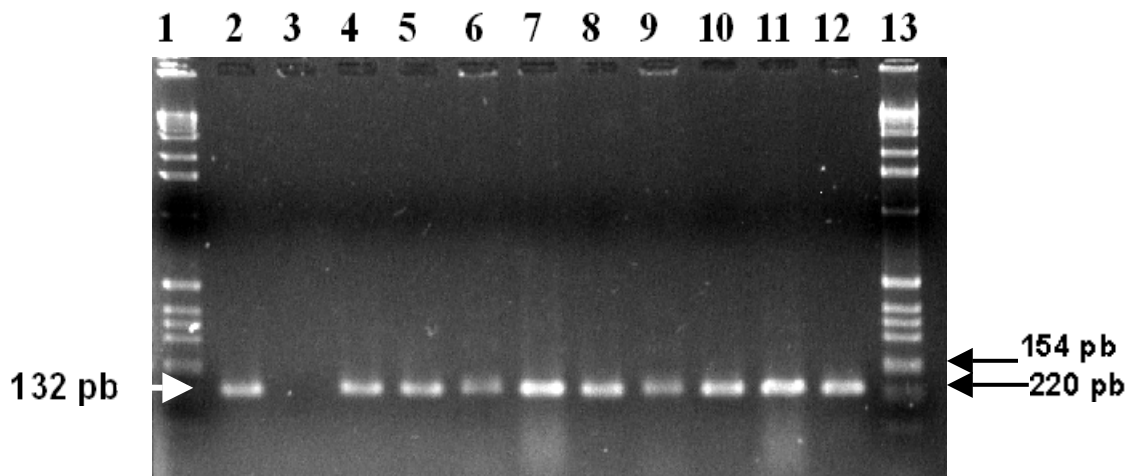


Figura 20. Productos amplificados a partir de un fragmento del gen de β -actina, mediante RT-PCR de muestras sanguíneas de pacientes diagnosticados con EM.

Gel de agarosa al 2% en TAE. En los carriles 1 y 13 se muestran los marcadores 1 kb DNA Ladder. En el carril 2 se observa el producto amplificado de un fragmento del gen de β -actina a partir de ARN de células HeLa; en el carril 3 se encuentra el testigo negativo (agua). En los carriles 4 al 12 se encuentran los productos amplificados a partir de un fragmento del gen de β -actina a partir de ARN de muestras de pacientes diagnosticados con EM.

6.8 AMPLIFICACIÓN DE UN FRAGMENTO DEL GEN DE LA FOSFOPROTEÍNA DEL VMC A PARTIR DE LAS MUESTRAS SANGUÍNEAS EXPERIMENTALES

Se realizó la RT-PCR en dos pasos para la amplificación de un fragmento del gen de la fosfoproteína del VMC. En los ensayos de PCR se incluyeron un control positivo (células vero infectadas con VMC cepa Onderstepoort y/o encéfalo con previo diagnóstico mediante inmunofluorescencia y RT-PCR) y como testigo negativo agua y/o células vero sin infectar.

A partir de una de las muestras analizadas se obtuvo un producto de amplificación, con un peso molecular compatible con el del fragmento del gen de la fosfoproteína del VMC, amplificado en el control positivo. **(Figura 21)**

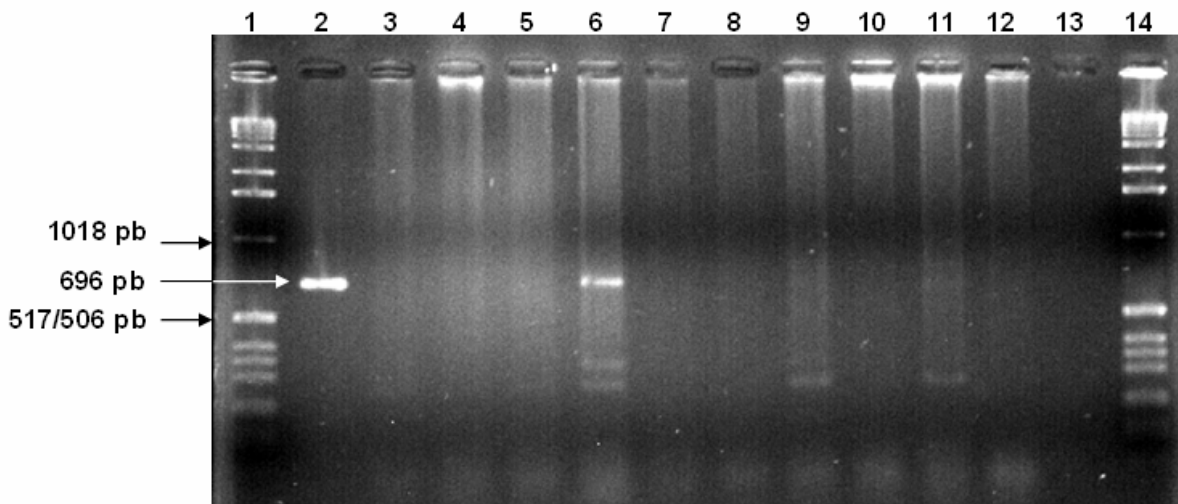


Figura 21. Producto amplificado por medio de RT-PCR a partir de una muestra de ARN de un paciente diagnosticado con EM

Gel de agarosa al 1% en TAE. En los carriles 1 y 14 se muestra el marcador 1 kb ADN Ladder. En el carril 2 se encuentra el testigo positivo (encéfalo con diagnóstico positivo de VMC) y en el carril 13 se encuentra el testigo negativo (agua). En los carriles 3 al 12 se encuentran reacciones de PCR de muestras sanguíneas de pacientes con EM; Siendo el carril 6 donde se observa un producto amplificado.

7. DISCUSIÓN

En el presente trabajo, se estandarizó y utilizó la técnica de RT-PCR para detectar un fragmento de 696 pb de la fosfoproteína del VMC en muestras sanguíneas de pacientes diagnosticados con EM.

Se utilizaron muestras sanguíneas para obtener el ARN total de los leucocitos, con el objetivo de realizar ensayos de RT-PCR en los tres grupos experimentales; ya que mediante esta técnica y con este tipo de muestra se ha informado de la detección de este virus en pacientes caninos ^{118, 148}. Se corroboró mediante la estandarización de la técnica, con muestras sanguíneas de perros diagnosticados con VMC, en los que se obtuvo el producto amplificado correspondiente a 696 pb mediante RT-PCR en un solo paso, además de la amplificación de un fragmento del gen de la β -actina con una RT-PCR de dos pasos para el caso de muestras de humanos.

Dado que el grupo de pacientes diagnosticados con EM es reducido en cuanto al número de integrantes, no se tomó como criterio de inclusión tener mascota o haber tenido exacerbaciones recientes ya que en algunos casos, estas se han asociado con la presencia de algún microorganismo ^{56, 57, 58}, lo cual hubiera reducido el número de muestra. Por esta razón se realizó un escrutinio general, tomando en cuenta únicamente los criterios de inclusión que se abordaron en la parte de materiales y métodos. Es preciso agregar, que no se solicitó la suspensión de medicamento alguno, previo a la toma de la muestra. Este factor pudo influir en la obtención de una capa leucoplaquetaria menos densa que la de los otros dos grupos experimentales, probablemente reduciendo la visualización de los productos amplificados. Dado que la mínima cantidad de ARN por pozo que puede ser observado en un gel desnaturizante es de 2 μ g ¹³⁴. El ARN obtenido en algunas muestras fue insuficiente para ser visualizado, por lo que se realizaron geles de agarosa al 1% para estas muestras. Por esta razón las fotografías de los geles 15 a la 19 muestran diferencias en la concentración de ARN obtenido de personas sanas y de pacientes con EM. Es preciso mencionar, que los pesos de

las bandas de ARN no corresponden al real por no encontrarse en un gel desnaturalizante; sin embargo, fue importante visualizar la integridad del ARN, además de detectar restos de ADN contaminante en algunas muestras los cuales fueron eliminados con DNAsas. Además, la pureza del ARN también se determinó de manera cuantitativa calculando la proporción A_{260}/A_{280} que osciló de manera general entre 1.6 y 2.0, lo cual se considera adecuado, respecto a los parámetros sugeridos por otros autores ¹⁴⁵. Lo antes mencionado confirma que los procedimientos que se siguieron con las muestras fueron adecuados, lo cual pudo ser confirmado posteriormente por la amplificación del control de β -actina; fragmento que se pudo amplificar en todos los grupos experimentales a partir de muestras sanguíneas.

Respecto a la amplificación del producto de origen viral, se obtuvo un amplificado de peso molecular compatible al del control positivo de VMC a partir de una muestra donada por un paciente diagnosticado con EM. Si se considerara procesar otra muestra de este paciente, se debe tomar en cuenta que los resultados podrían no estar vinculados, ya que el periodo entre la primer toma de muestra y una reciente, tendría un intervalo no menor a seis meses; con posibilidades inciertas de obtener un producto amplificado ya que el virus persiste en células linfoides y SNC por periodos aún no bien determinados que oscilan alrededor de 90 días para el caso de pacientes caninos ¹²². La realización de un estudio de esta naturaleza resulta complicada dada las dificultades para la aceptación de la toma de muestras sanguíneas en pacientes con EM. Por esta razón la toma de una muestra única dificulta la realización de repeticiones de las pruebas que permitan a llegar a resultados concluyentes.

Según la información vertida en el cuestionario respecto a las características generales del paciente cuya muestra amplificó el producto, son las siguientes: paciente de sexo masculino con 48 años de edad, sin antecedentes familiares con enfermedades neurológicas, además tiene como mascota un perro que habita dentro de casa y del cual no se conoce su esquema de vacunación. La relación

estrecha del paciente con su mascota la han considerado como una característica de asociación entre el VMC con la EM debido al contacto del humano con las secreciones de sus mascotas; sin embargo, el hecho de que sólo sean determinaciones basadas en la observación le han restado importancia ^{1, 2, 3, 4, 5}.

En estudios serológicos realizados con muestras de LCR y suero, se han medido títulos de anticuerpos contra VMC más altos en pacientes diagnosticados con EM, que en los grupos control ⁶; sin embargo, la antigenicidad cruzada entre VMC y el VS, hacen difícil la interpretación de los resultados mediante esta prueba ^{7, 8, 9}; de manera más reciente, se realizaron estudios de inmunohistoquímica en muestras de pacientes con EM utilizando anticuerpos monoclonales, los cuales reconocieron un epítipo conservado en la proteína de fusión de los Morbillivirus ¹⁰ y el presente trabajo coincide de manera parcial con estos estudios, proponiendo que el mecanismo mediante el cual se puede producir el daño es el *bystander activation* y no directamente el VMC sea el que genere las lesiones en el SNC.

Teniendo como base, que dichos pacientes presentan un mayor número de infecciones virales previo a la presentación clínica de la EM ⁵⁹, tal es el caso del sarampión, el cual el 53.125% de los pacientes muestreados tiene conocimiento de haberse infectado con este virus. También es preciso destacar que sólo el 28.125% de los pacientes con EM tiene familiares con alguna enfermedad neurológica, por lo que se puede apoyar la idea de que además de la susceptibilidad genética, existen factores asociados a la presentación de la EM ^{51, 58, 59}.

Aún no se ha determinado qué tan importante es el contacto de las personas con las secreciones de perros infectados con VMC. En todo caso este virus no sería el único factor asociado a la presentación de la EM en individuos susceptibles de presentar la enfermedad, dado que el 78.125 % de los pacientes que participaron en el estudio tienen como mascota un perro; además de que el 77.77% de las mascotas de los pacientes, tienen contacto con perros ajenos a su hogar y de los

cuales se desconoce su esquema de vacunación; razón por la cual, el VMC podría ser transmitido de mascota a mascota y permanecer de manera silente ¹²². Por estas razones se concluye que el ARN del VMC sí puede ser identificado en leucocitos de pacientes con EM con características particulares aún no determinadas.

8. CONCLUSIONES

Se estandarizó una técnica de RT-PCR para detectar VMC a partir de muestras sanguíneas, paralelamente con la amplificación de un fragmento del gen de β -actina como control.

Se amplificó un producto de peso molecular compatible al del control positivo del virus del moquillo canino, mediante RT-PCR a partir de una muestra donada por un paciente diagnosticado con EM. Resulta indispensable la secuenciación dicho producto, para confirmar su origen y así corroborar la presencia del virus.

El presente trabajo se considera el primer estudio en México, destinado al estudio del VMC en muestras de pacientes diagnosticados con EM

9. PROSPECTIVAS

Prospectivas a corto plazo.

Realizar un ensayo con enzimas de restricción y complementarlo con la secuenciación del producto que se amplificó a partir de la muestra de un paciente diagnosticado con EM, para corroborar la presencia del ARN viral.

Prospectivas a largo plazo.

Establecer una línea de investigación con participación conjunta de una institución de seguridad social, que permita el procesamiento de distintas muestras con el propósito de:

Realizar estudios profundos sobre la participación de los Paramixovirus que se han asociado con la EM (virus de sarampión, rubéola, virus de la parotiditis y moquillo canino), con particular énfasis en este último virus, por la importancia en el área de medicina veterinaria.

Realizar RT-PCR en muestras de pacientes con EM, en periodos de exacerbación con la finalidad de localizar los agentes virales antes mencionados.

Realizar estudios *in vitro* sobre la participación de los receptores de VMC en células de humano.

1.-Warren SA, Warren KG, Greenhill S, Paterson M. How multiple sclerosis is related to animal illness, stress and diabetes. Can Med Assoc J. 1982;126(4):377-382.

-
- 2.-Beltran I, Molto-Jorda JM, Díaz-Marín C, Martín R, Matías-Guiu J. Analytical epidemiological study of multiple sclerosis in Alcoi. *Rev Neurol* 1998;26(149):67-69.
 - 3.-Thomas M, Robertson M. Multiple sclerosis in a Glasgow tenement. *Scott Med J*. 1984;29(4):244-6.
 - 4.-Warren SA, Warren KG, Greenhill S, Paterson M. How multiple sclerosis is related to animal illness, stress and diabetes. *Can Med Assoc J*. 1982;126(4):377-382.
 - 5.-Beltran I, Molto-Jorda JM, Díaz-Marín C, Martín R, Matías-Guiu J. Analytical epidemiological study of multiple sclerosis in Alcoi. *Rev Neurol* 1998;26(149):67-69.
 - 6.-Rohowsky KC, Dowling DC, Stuart D y Cook SD. Canine distemper virus-specific antibodies in multiple sclerosis. *Neurology* 1995;45:1554-1560.
 - 7.-Cook SD, Rohowsky-Kochan C, Bansil S, Dowling PC. Evidence for multiple sclerosis as an infectious disease.. *Acta Neurol Scand Suppl* 1995;161:34-42.
 - 8.-Summers BA, Appel MJ. Aspects of canine distemper virus and measles virus encephalomyelitis. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 1994;20(6):525-34
 - 9.-McStreet GH, Elkunk RB, Latiwonk QI. Investigations of environmental conditions during cluster indicate probable vectors of unknown exogenous agent(s) of multiple sclerosis. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 1992;15(1):75-7.
 - 10.-Geeraedts CA, Wilczak N, Van Binnendijk R, De Keyser J. Search for morbillivirus proteins in multiple sclerosis brain tissue. *SourceNeuroreport* 2004;15(1):27-32.

10. REFERENCIAS

- 1.-Murray TJ. Multiple sclerosis. The history of a disease. EUA:Demos, 2005.
- 2.-Putnam T J. Evidence of vascular occlusion in multiple sclerosis and "encephalomyelitis". Arch Neurol Psychiatry 1937;1298-1321.
- 3.-SwankRL. Multiple sclerosis: A correlation of its incidence with dietary fat. Am J Med Sci 1950;220:441-450.
- 4.-Baker RWR, Thompson RHS, Zilkha KJ. Fatty acid composition of brain lecithins in multiple sclerosis. Lancet 1963;1:26-27.
- 5.-Garcea-Correale. Vivir con esclerosis múltiple. Argentina: Médica Panamericana, 2003.
- 6.-Núñez OL, editor. El manejo integral de los pacientes con Esclerosis Múltiple. México: Prado S.A de C.V. Asociación Médica Mexicana para el Estudio de la Esclerosis Múltiple. 2003.
- 7.-Mc Donald WI, Compston A, Edan G, et al. Recommended Diagnostic Criteria for Multiple Sclerosis : Guidelines from the Internacional Panel on th Diagnosis of Multiple Sclerosis. Ann Neurol 2001;50:121-127.
- 8.-Lublin FD, Reingold SC. Defining the clinical course of multiple sclerosis: results of an international survey. Neurology 1996;46:906-911.
- 9.-Horwitz MS, Sarvetnick N. Viruses, host responses, and autoimmunity. Immunol Rev 1999;169:241–253.
- 10.-Lucchinetti C, Brück W, Noseworthy JH. Multiple sclerosis: recent developments in neuropathology, pathogenesis , magnetic resonance imaging and treatment. Curr Opin Neurol 2001;14:259-269.
- 11.-De Keyser, Jacques CA, Wilczak, et al. Disappearance of [beta]2-adrenergic receptors on astrocytes in canine distemper encephalitis: possible implications for the pathogenesis of multiple sclerosis. Neuroreport 2001;12(2):191-194.
- 12.-Pasantes H, Arias C, Massieu L, Zentella A, Tapia R. Enfermedades neurodegenerativas. Mecanismos celulares y moleculares. México: Fondo de Cultura Económica, 1999.

- 13.-Zipp F, Aktas O. The brain as a target of inflammation: common pathways link inflammatory and neurodegenerative diseases. *Trends in neurosciences* 2006;3(1):1-9.
- 14.-Yauch RL, Kim BS. A predominant viral epitope recognized by T cells from the periphery and demyelinating lesions of SJL/J mice infected with Theiler's virus is located within VP1(233-244). *J Immunol.* 1994;153:4508–4519.
- 15.-Kurtz CI, Sun XM, Fujinami RS. B-lymphocyte requirement for vaccine-mediated protection from Theiler's murine encephalomyelitis virus-induced central nervous system disease. *J Virol* 1995;69:5152–5155.
- 16.-Rodriguez M, Pavelko KD, Njenga MK, Logan WC, Wettstein PJ. The balance between persistent virus infection and immune cells determines demyelination. *J Immunol* 1996;157:5699–5709.
- 17.-Brahic M. Monteyne P. y Bureau J.F. Virus y esclerosis múltiple. Francia: Instituto Pasteur. Trad. Cuba J. M. y Díaz A. Unidad de Retrovirus y Prevención del SIDA, 1998.
- 18.-Piras MR, Magnano J, Canu ED, Paulus KS, Satta WM, Soddu A, et al. Longitudinal study of cognitive dysfunction in multiple sclerosis: neuropsychological, neuroradiological, and neurophysiological findings. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2003 Jul;74(7):878-85.
- 19.-Sailer M, Fischl B, Salat D, Tempelmann C, SchoEnfeld MA. Focal thinning of the cerebral cortex in multiple sclerosis, *Brain* 2003;126:1734–1744.
- 20.-Inglese M, Ge Y, Filippi M, Falini A, Grossman RI, Gonen O. Indirect evidence for early widespread gray matter involvement in relapsing–remitting multiple sclerosis. *NeuroImage* 2004;21:1825–1829.
- 21.-Cook SD. Handbook of multiple sclerosis. 3^a ed. EUA: Marcel Dekker. 2001.
- 22.-Arnett HA, Mason J, Marino M, Suzuki K, Matsushima GK, Ting JP. TNF α promotes proliferaci3n de oligodendrocyte progenitors and remyelination. *Nature* 2001;4(11):1116-1122.
- 23.-Wujek JR, Bjartmar C, Richer E, Ransohoff RM, Yu M, Tuohy VK, Trapp BD. Axon loss in the spinal cord determines permanent neurological disability in an animal model of multiple sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2002;61:23–32.

- 24.-Grigoriadis N, Ben-Hur T, Karussis D, Milonas I. Axonal damage in multiple sclerosis: a complex issue in a complex disease. *Clin Neurol Neurosurg*. 2004;106:211–217.
- 25.-Grigoriadis N, Tselios T, Deraos S, Orologas A, Deraos G, Matsoukas J, Mavromatis I, Milonas I. Animal models of central nervous system immune-mediated diseases: therapeutic interventions with bioactive peptides and mimetics. *Curr Med Chem* 2005;12:1513–1519.
- 26.-Filippi M, Bozzali M, Rovaris M, Gonen O, Kesavadas C, Ghezzi A, Martinelli V, Grossman RI, Scotti G, Comi G, Falini A. Evidence for widespread axonal damage at the earliest clinical stage of multiple sclerosis. *Brain* 2003;126:433–437.
- 27.-McGavern DB, Murray PD, Rivera-Quinones C, Schmelzer JD, Low PA, Rodriguez M. Axonal loss results in spinal cord atrophy, electrophysiological abnormalities and neurological deficits following demyelination in a chronic inflammatory model of multiple sclerosis. *Brain* 2000;123(3):519–531.
- 28.-Ure D, Rodriguez M. Extensive injury of descending neurons demonstrated by retrograde labeling in a virus-induced murine model of chronic inflammatory demyelination. *J Neuropathol Exp Neurol* 2000;59:664–678.
- 29.-Sofroniew MV, Isacson O. Distribution of degeneration of cholinergic neurons in the septum following axotomy in different portions of the fimbria–fornix: a correlation between degree of cell loss and proximity of neuronal somata to the lesion, *J Chem Neuroanat* 1988;1:327–337.
- 30.-Corona T, Román GC. Multiple Sclerosis in Latin America. *Neuroepidemiology* 2006;26:1–3.
- 31.-Corona T, editor. *Esclerosis múltiple*. México: Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Manuel Velasco Suárez. 2000.
- 32.-Andersson M, Alvarez-Cermeño J, Bernardi G, Cogato I, Fedman P, *et al*. Cerebrospinal fluid in the diagnosis of multiple sclerosis: a consensus report. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1994;57(8):897-902.
- 33.-Garren H, Steinman L, Lock C. The specificity of the antibody response in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 1998;43:4–6.

- 34.-Gronseth GA, Ashman EJ. Practice parameter: the usefulness of evoked potentials in identifying clinically silent lesions in patients with suspected multiple sclerosis. *Neurology* 2000;54:1720-1725.
- 35.-Pohl d, Rostasy K, Treiber-Held S, Brockmann K, Gärtner J, Hanefeld F. Pediatric multiple sclerosis: detection of clinically silent lesions by multimodal evoked potentials. *The journal of pediatrics* 2006;149(1):125-127.
- 36.-Fazekas F, Offenbacher H, Fuchs S, et al. Criteria for an increased especificity of MRI interpretation in edery subjects with suspected multiple sclerosis. *Neurology* 1998;38:1822-1825.
- 37.-Offenbacher H, Fazekas F, Schmidt R, et al. Assessment of MRI criteria for a diagnosis of MS. *Neurology* 1993;43:905-909.
- 38.-Barkhof F, Filippi M, Miller DH, et al . Comparision of MR imaging criteria at first presentation to predict conversion to clinically definite multiple slclerosis. *Brain* 1997;120:2059-2069.
- 39.-Tintoré M, Rovira A, Martínez M, et al. Isolated demyelinating syndromes: comparation of different MR imaging criteria to predict conversion to clinically definite multiple sclerosis. *Am J Neuroradiol* 2000;21:702-706.
- 40.-Ebers GC, Sadovnik AD, Risch NJ. A genetic basis for familial aggregation in multiple sclerosis. *Nature* 1995;377:150-151.
- 41.-Alález C, Corona T, Ruano L, Flores H, Loyola M, Gorodezky C. Mediterranean and Amerindian MHC class II alleles are associated with multiple sclerosis in Mexicans. *Acta Neurol Scand* 2005;112: 317–322.
- 42.-Alastair C. Genetic epidemiology of múltiple sclerosis. *Journal of neurology, neurosurgery and psychiatry* 1997;62.:553-561.
- 43.-Vella V.A review of the etiology of multiple sclerosis. *Ital J Neurol Sci.* 1984;5(4):347-56.
- 44.-Turgeon ML. Immunology and serology in laboratory medicine. 3a. ed EUA: Mosby, 2003.
- 45.-Compston A. The genetic epidemiology of multiple sclerosis. *Phil Trans R soc Lon B* 1999;354:1623-1634.

- 46.-Kurtzke JF. Epidemiologic contributions to multiple sclerosis: An overview. *Neurology* 1980;30(7 pt 2):61-79.
- 47.-Compston A, Kellar-Wood, Wood N. Multiple sclerosis. *Baill Clin Neurol*. 1994;3:353-371.
- 48.-Kurtzke JF, Hyllested K, Heltberg A. Multiple sclerosis in the Faroe Islands. The occurrence of the fourth epidemic as validation of transmission. *Acta Neurol Scand* 1993;88:161-173.
- 49.-Kurtzke JF, Hyllested K, Heltberg A. Multiple sclerosis in the Faroe Islands: transmission across four epidemics. *Acta Neurol Scand* 1995;91(5):321-325.
- 50.-Kurtzke JF. Epidemiologic Evidence for Multiple Sclerosis as an Infection. *Clin Microbiol Rev* 1993;6(4)382-427.
- 51.-Gilden DH. Infectious causes of multiple sclerosis. *Lancet Neurol* 2005;4:195–202.
- 52.-Roach ES. Is multiple sclerosis an autoimmune disorder? *Arch Neurol* 2004;61:1615–1616.
- 53.-Pryse-Phillips WE. The incidence and prevalence of multiple sclerosis in Newfoundland and Labrador, 1960-1984. *Ann Neurol* 1986;20(3):323-328.
- 54.-Buchmeier MJ, Lane TE. Viral-induced neurodegenerative disease. *Curr Opin Microbiol*. 1999;2:398–402.
- 55.-Grigoriadis N, Hadjigeorgiou GM. Virus-mediated autoimmunity in Multiple Sclerosis. *Autoimmune Dis* 2006;3:1.
- 56.-Kriesel JD, Sibley WA. The case for rhinoviruses in the pathogenesis of multiple sclerosis. *Mult Scler* 2005;11:1–4.
- 57.-Gilden DH. Multiple sclerosis exacerbations and infection. *Lancet Neurol* 2002;1:145.
- 58.-Buljevac D, Flach HZ, Hop WC, Hijdra D, Laman JD, Savelkoul HF, van Der Meche FG, van Doorn PA, Hintzen RQ. Prospective study on the relationship between infections and multiple sclerosis exacerbations. *Brain*. 2002;125:952–960
- 59.-Martyn CN. The epidemiology of multiple sclerosis. *Acta Neurol Scand Suppl* 1997;169:3-7.

- 60.-Bednarová J, Stourac P, Adam P. Relevance of immunological variables in neuroborreliosis and multiple sclerosis. *Acta Neurol Scand* 2005;112(2):97-102
- 61.-Sriram S, Yao SY, Stratton C, Calabresi P, Mitchell W, Ikejima H, Yamamoto Y. Comparative study of the presence of *Chlamydia pneumoniae* in cerebrospinal fluid of Patients with clinically definite and monosymptomatic multiple sclerosis. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2002;9(6):1332-1337.
- 62.-Duncan Clark. Human Herpesvirus Type 6 and Multiple Sclerosis. *Herpes* 2004;11(2).
- 63.-Challoner PB, Smith KT, Parker JD, MacLeod DL, Coulter SN, Rose TM, Schultz ER, Bennett JL, Garber RL, Chang M, et al. Plaque-associated expression of human herpesvirus 6 in multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995;92:7440–7444.
- 64.-Hela-Felicitas P, Reske D. Expansion of antibody reactivity in the cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients - follow-up and clinical implications. *Cerebrospinal Fluid Res* 2005;27;2:3.
- 65.-Field EJ, Cowshall S, Narang HK, Bell TM. Viruses in multiple sclerosis? *Lancet.* 1972;2:280–281.
- 66.-Atkins GJ, McQuaid S, Morris-Downes MM, Galbraith SE, Amor S, et al. Transient virus infection and multiple sclerosis. *Rev Med Virol* 2000;10(5):291-303.
- 67.-Yeh EA, Collins A, Cohen ME, Duffner PK, Faden H. Detection of coronavirus in the central nervous system of a child with acute disseminated encephalomyelitis. *Pediatrics* 2004;113(1 Pt 1):73-76.
- 68.-Clausen J. Endogenous retroviruses and MS: using ERVs as disease markers. *Int MS J* 2003;10(1):22-28.
- 69.-Perron H, Garson JA, Bedin F, Beseme F, Paranhos-Baccala G, Komurian-Pradel F, Mallet F, Tuke PW, Voisset C, Blond JL, Lalande B, Seigneurin JM, Mandrand B. Molecular identification of a novel retrovirus repeatedly isolated from patients with multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94:7583–7588.
- 70.-Ascherio A, Munger KL, Lennette ET, Spiegelman D, Hernan MA, Olek MJ, Hankinson SE, Hunter DJ. Epstein-Barr virus antibodies and risk of multiple sclerosis: a prospective study. *Jama.* 2001;286:3083–3088.

- 71.-Hernan MA, Zhang SM, Lipworth L, Olek MJ, Ascherio A. Multiple Sclerosis and Age at Infection with Common Viruses. *Epidemiology* 2001;12(3): 301-306.
- 72.-Norman JE Jr, Cook SD, Dowling PC. Household pets among veterans with multiple sclerosis and age-matched controls. Pilot survey. *Arch Neurol* 1983;40(4):213-214.
- 73.-Mititelu G, Bourceanu I. Multiple sclerosis and exposure to household dogs. *Preliminary Virologie* 1984;35(3):233-235.
- 74.-Rima BK, Duprex WP. Morbilliviruses and human disease. *J Pathol*. 2006;208(2):199-214.
- 75.-Cook SD, Dowling PC. A possible association between house pets and multiple sclerosis. *Lancet* 1977;1:980-982.
- 76.-Nagelkerken L. Role of Th1 and Th2 cells in autoimmune demyelination disease. *Braz J Med Biol Res*. 1998;31(1):55-60.
- 77.-Koestner A. Animal model of human disease: subacute sclerosing panencephalitis, multiple sclerosis; animal model: distemper-associated demyelinating encephalomyelitis. *Am J Pathol* 1975;78(2):361-364.
- 78.-Adams JM, Brown WJ, Snow HD, et al. Old dog encephalitis and demyelinating diseases in man. *Vet Pathol* 1975;12(3):220-226.
- 79.-Summers BA, Greisen HA, Appel MJ. Does virus persist in the uvea in multiple sclerosis, as in canine distemper encephalomyelitis? *Lancet*. 1983;13(2):372-5.
- 80.-Vandeveld M, Higgins RJ, Kristensen B, Kristensen F, Steck AJ, Kihm U. Demyelination in experimental canine distemper virus infection: immunological, pathologic, and immunohistological studies. *Acta Neuropathol* 1982;56:285-293.
- 81.-Ochikubo F, Nagata T, Yoshikawa Y, Matsubara Y, Kai C, Yamanouchi Y. Electroencephalogram and evoked potentials in the primate model of viral encephalitis. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 1993;88(5):397-407.
- 82.-Shishido A, Yamanouchi K. Encephalomyelitis induced by paramyxovirus in nonhuman primates with a special reference to possible viral etiology of multiple sclerosis. *Neurology* 1976;26(6 PT 2):83-84.

- 83.-Warren SA, Warren KG, Greenhill S, Paterson M. How multiple sclerosis is related to animal illness, stress and diabetes. *Can Med Assoc J.* 1982;126(4):377-382.
- 84.-Beltran I, Molto-Jorda JM, Díaz-Marín C, Martín R, Matías-Guiu J. Analytical epidemiological study of multiple sclerosis in Alcoi. *Rev Neurol* 1998;26(149):67-69.
- 85.-Thomas M, Robertson M. Multiple sclerosis in a Glasgow tenement. *Scott Med J.* 1984;29(4):244-6.
- 86.-Rohowsky KC, Dowling DC, Stuart D y Cook SD. Canine distemper virus-specific antibodies in multiple sclerosis. *Neurology* 1995;45:1554-1560.
- 87.-Cook SD, Rohowsky-Kochan C, Bansil S, Dowling PC. Evidence for multiple sclerosis as an infectious disease.. *Acta Neurol Scand Suppl* 1995;161:34-42.
- 88.-Geeraedts CA, Wilczak N, Van Binnendijk R, De Keyser J. Search for morbillivirus proteins in multiple sclerosis brain tissue. *SourceNeuroreport* 2004;15(1):27-32.
- 89.-International Committee on Taxonomy of Viruses. ICTV. Disponible en URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb>
- 90.-Collier L, Balows A y Sussman M. *Microbiology and Microbial Infections. Paramyxoviruses.* Virology Vol. 1, 1998.
- 91.-Smith Ca, Wood EJ. *Biología celular.* México: Addison Wesley Longman, 1998
- 92.-Smith Ca, Wood EJ. *Moléculas biológicas.* México: Addison Wesley Longman, 1998
- 93.-Messling VV, Zimmer G, Herrler G, Haas L, Cattaneo R. The hemagglutinin of canine distemper virus determines tropism and cytopathogenicity. *J Virol* 2001;75(14):6418-6427.
- 94.-Cherpillod P, Beck K, Zurbriggen A, Wittek R. Sequence analysis and expression of the attachment and fusion protein of canine distemper virus wild-type strain A75/17. *J Virol* 1999;73(3):2263-2269.
- 95.-Hass L, Liermann H, Harder TC, Barrett T, Löchelt M, Messling V et al. Analysis of the gene, the central untranslated region and the proximal coding part of

the F gene of wild-type and vaccine canine distemper viruses. *Veterinary Microbiology* 1999;69:15-18.

96.-Wild TF, Naniche D, Rabourdin –Combe C, Gerlier D, Malvoisin E, et al. Mode of entry of morbilliviruses. *Veterinary Microbiology* 1999;44:267-270.

97.-Stern LB, Greenberg M, Gershoni JM, Rozenblatt S. The Hemagglutinin Envelope Protein of Canine Distemper Virus (CDV) Confers Cell Tropism as Illustrated by CDV and Measles Virus Complementation Analysis. *Journal of Virology* 1995;69(3):1661–1668.

98.-Barret T, Clarke SA, Evans, Rima BK. The nucleotide sequence of the gene encoding the F protein of the deduced amino acid sequence with other paramyxoviruses. *Virus Res* 1987;8:373-386.

99.-Tatsuo H, Yanagi Y. The morbillivirus receptor SLAM (CD150). *Microbiol Immunol* 2002;46(3):135-142.

100.-Yanagi Y, Takeda M, Ohno S, Seki F. Measles virus receptors and tropism. *J Infect Dis* 2006; 59:1-5.

101.-Galbraith SE, Tiwari A, Baron MD, Lund BT, Barret T, Cosby SL. Morbillivirus downregulation of CD46. *Journal of Virology* 1998;72(12): 10292-10297.

102.-Lan NT, Yamaguchi R, Uchida K, Sugano S, Tateyama S. Growth profiles of recent canine distemper isolates on vero cells expressing canine Signalling Lymphocyte Activation Molecule (SLAM). *J Comp Path* 2005; 133:77-81.

103.-Tipold A, Vandeveld M, Jaggy A. Neurological manifestations of canine distemper virus infection. *Journal of Small Animal Practice* 1992;33:466-470.

104.-Wise DJ, Carter GR. *Viral Replication and Genetics*. In: Carter G.R., Wise D.J. and Flores E.F. (Eds.), *A Concise Review of Veterinary Virology*. Ithaca: International Veterinary Information Service. 2005. Disponible en: www.ivis.org.

105.-Cathomen T, Mrkic D, Spehner R, Drillien R, et al. A matrix-less measles virus is infectious and elicits extensive cell fusion : consequences for propagation in the brain. *EMBO J* 1998:3899-3908.

106.-Zurbriggen a, Graber HU, Wagner A, Vandeveld M. Canine distemper virus persistence in the nervous system is associated with noncytolytic selective virus spread. *J Virol* 1995;69:1678-1686.

- 107.-Isaacson SH, Asher DM, Godec MS, Gibbs Jr CJ, Gajdusek DC. Widespread, restricted low-level measles virus infection of brain in a case of subacute sclerosing panencephalitis. *Acta Neuropathol* 1996;9:1-13.
- 108.-Billeter MA, Cattaneo R, Spielhofer P, Kaelin K, Huber M, Schmid A, et al. Generation and properties of measles virus mutations typically associated with subacute sclerosing panencephalitis. *Ann NY Acad Sci* 1994;724:367-377.
- 109.-Blancou J. History of the surveillance and control of transmissible animal diseases. Francia: Office International des Epizooties, 2003.
- 110.-Sidhu MS, Husar W, Cook SD, Dowling PC, Udem SA. Canine distemper terminal and intergenic non-protein coding nucleotide sequences: completion of the entire CDV genome sequence. *Virology* 1992;193(1):66-72.
- 111.-Millian S, Maisel JC, Kempe H, Plotkin S, Pagano J, Warren J. Antibody response of man to canine distemper virus. *Notes* 79:616-618.
- 112.-Johnson RT. Inflammatory and demyelinating disease. In: *Viral Infection of the Nervous System*. Raven Press, 1982.
- 113.-Cook SD, Dowling PC, Russell WC. Neutralizing antibodies to canine distemper and measles virus in multiple sclerosis. *J Neurol Sci* 1979;41(1):61-70.
- 114.-Madden DL, Wallen WC, Houff SA, Shekarchi IC, Leinikki PO, Castellano GA, Sever JL. Measles and canine distemper antibody. Presence in sera from patients with multiple sclerosis and matched control subjects. *Arch Neurol* 1981;38(1):13-15.
- 115.-Appel MJ, Glickman LT, Raine CS, Tourtellotte WW. Canine viruses and multiple sclerosis. *Neurology* 1981;31(8):944-949.
- 116.-Confer AW, Kahn DE, Koestner A, Krakowka S. Biological properties of a canine distemper virus isolate associated with demyelinating encephalomyelitis. *Infect Immun.* 1975;11(4):835-44.
- 117.-Appel MJ, Shek WR, Summers BA. Lymphocyte-mediated immune cytotoxicity in dogs infected with virulent canine distemper virus. *Infect Immun* 1982;37(2):592-600.
- 118.-Mizak B, Rzezutka A. Application of N-PCR for diagnosis of distemper in dogs and fur animals. *Veterinary Microbiology* 2002;(88):95-103.

- 119.-Appel MJ, Yates RA, Foley GL, Bernstein JJ, Santinelli S, Spelman LH, Miller LD, Arp LH, Anderson M, Barr M, et al. Canine distemper epizootic in lions, tigers, and leopards in North America. *J Vet Diagn Invest* 1994;6(3):277-288.
- 120.-Roelke-Parker ME, Munson L, Packer C, Kock R, Cleaveland S, Carpenter M, O'Brien SJ, Pospischil A, Hofmann-Lehmann R, Lutz H, et al. A canine distemper virus epidemic in Serengeti lions (*Panthera leo*) *Nature* 1996;1;379;(6564):441-445.
- 121.-Saliki JT, Lehenbauer TW. Monoclonal Antibody-Based Competitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Detection of Morbillivirus Antibody in Marine Mammal Sera. *Clin Microbiol* 2001;39(5):1877–1881.
- 122.-Greene C. E. Enfermedades infecciosas en perros y gatos. 2ª ed México: McGraw-Hill Interamericana, 2000.
- 123.-Bollo E, Zurbriggen A, Vandeveld M, Fankhauser R. Canine distemper virus clearance in chronic inflammatory demyelination. *Acta Neuropathol* 1986;72:69-73.
- 124.-Griot-Wenk M, Griot C, Pfister H, Vandeveld M. Antibody-dependent cellular cytotoxicity in antimyelin antibody-induced oligodendrocyte damage in vitro. *J Neuroimmunol* 1991;33:145-155.
- 125.-Higgins RJ, Krakowa SG, Metzler AE, Koestner A. Primary demyelination in experimental canine distemper virus induced encephalomyelitis in gnotobiotics dogs. *Acta Neuropathologica*. 1982;58:1-8.
- 126.-Stettler M, Beck K, Wagner A, Vandeveld M, Zurbriggen A. Determinants of persistence in canine distemper viruses. *Veterinary Microbiology* 1996;57:83-93.
- 127.-Barret T. Morbillivirus infections, with special emphasis on morbilliviruses of carnivores. *Veterinary Microbiology* 1999;69:3-13.
- 128.-Zurbriggen A, Schmid I, Graber HM, Vandeveld M. Oligodendroglial pathology in canine distemper. *Acta Neuropathologica* 1998;95:71-77.
- 129.-Griot C, Burge T, Vandeveld M, Peterhans E. Bystander demyelination through antibody induced macrophage activation in canine distemper virus infection. *Schweizer Archiv für Neurologie und Psychiatrie* 1989;140:39-41.
- 130.-Appel MJG y Summers BA. Canine Distemper: Current Status. EUA: Institute of Animal Health, College of Veterinary Medicine, Cornell University, 1999.

- 131.-Rudd PA, Cattaneo R, Messling V. Canine distemper virus uses both the anterograde and the hematogenous pathway for neuroinvasion. *J Virol*. 2006;80(19):9361-9370.
- 132.-Van den P, Dalton P, Rose JK. Relative neurotropism of a recombinant rhabdovirus expressing a green fluorescent envelope glycoprotein. *J virol*. 2002;76:1309-1327.
- 133.-Koestner A. Animal model of human disease: subacute sclerosing panencephalitis, multiple sclerosis; animal model: distemper-associated demyelinating encephalomyelitis. *Am J Pathol* 1975;78(2):361-364.
- 134.-Adams JM, Brown WJ, Snow HD, et al. Old dog encephalitis and demyelinating diseases in man. *Vet Pathol* 1975;12(3):220-226.
- 135.-Ochikubo F, Nagata T, Yoshikawa Y, Matsubara Y, Kai C, Yamanouchi Y. Electroencephalogram and evoked potentials in the primate model of viral encephalitis. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 1993;88(5):397-407.
- 136.-Duffy PE. Functional implications of astrocyte metabolism. In: *Astocytes: Normal, Reactive and Neoplastic*. Raven Press. 1983 39-41.
- 137.-Thomas WB, Sorjonen DC, Streiss JE. A retrospective evaluation of 38 cases of canine distemper encephalomyelitis. *Journal of the American Animal Hospital Association*.1993;29:129-133.
- 138.-Vandeveld M, Zubriggen A, Higgins RJ, Palmer D. Spread and distribution of viral antigen in nervous canine distemper. *Acta Neuropathol* 1985;67-:211-218.
- 139.-Kirk R. W. *Terapéutica veterinaria en pequeños animales*. México: McGraw-Hill Interamericana, 1995.
- 140.-Quinn P. J., Carter M. T. et al. *Clinical Veterinary Microbiology*. España: Mosby. 2004.
- 141.-Koutinas AF, Polizopoulou, Baumgaertner, LekkasS, Kontos V. Relation of clinical signs to pathological changes in 19 cases of canine distemper encephalomyelitis. *J Comp Path*.2002;126:47-56
- 142.-Summer B, Cummings J, DeLahunta A. Canine distemper encephalomyelitis. *Veterinary Pathology* 1995:102-110.

- 143.-Castro E. A. y Heuschele W. P. Veterinary diagnostic virology. A practitioners's guide. EUA: Mosby Year Book, 1992.
- 144.-Johnson GC, Fenner WR, Krakowa S. Production of immunoglobulin G and increased antiviral antibody in cerebrospinal fluid of dogs lethally infected with delayed-onset canine distemper viral encephalitis. *Journal of Neuroimmunology* 1988;17:237-251.
- 145.-Farell RE. RNA methodologies. A laboratory guide for isolation and characterization. 2a. ed EUA:Academic Press, 1998
- 146.-Lan NT, Yamaguchi R, Kai K, et al. The Growth Profiles of Three Types of Canine Distemper Virus on Vero Cells Expressing Canine Signaling Lymphocyte Activation Molecule. *J Vet Med Sci* 2005;67(5):491-495.
- 147.-Rzezutka A, Mizak B. Application of N-PCR for diagnosis of distemper in dogs and fur animals. *Veterinary Microbiology* 88;(2002)95-103.
- 148.-Frisk AL, Köning 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* 1999;37(11):3634-3643.
- 149.-Ausbel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, et al editores. *Currents Protocols in Molecular Biology*. EUA: Wiley, 2001.
- 150.-Lin P, Hu SW, Chang TH. Correlation between Gene Expression of Aryl Hydrocarbon Receptor (AhR), Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator (Arnt), Cytochromes P4501A1 (CYP1A1) and 1B1 (CYP1B1), and Inducibility of CYP1A1 and CYP1B1 in Human Lymphocytes. *Toxicological Sciences* 2003;71:20-26.
- 151.-Lynnon Biosoft. DNAMAN (programa de cómputo) versión 3.0 Universidad Nacional Autónoma de México, 1994.
- 152.-National Center for Biotechnology Information. Genbank. Disponible en URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/Blast.cgi>
- 153.-Coria GE. Utilización de RT-PCR, ELISA y cultivo celular para detectar la presencia del virus de distemper en lobos marinos de California en Sonora (tesis de licenciatura). México D.F.: FMVZ- UNAM, 2005.

- 154.-Warren SA, Warren KG, Greenhill S, Paterson M. How multiple sclerosis is related to animal illness, stress and diabetes. *Can Med Assoc J.* 1982;126(4):377-382.
- 155.-Beltran I, Molto-Jorda JM, Díaz-Marín C, Martín R, Matías-Guiu J. Analytical epidemiological study of multiple sclerosis in Alcoi. *Rev Neurol* 1998;26(149):67-69.
- 156.-Thomas M, Robertson M. Multiple sclerosis in a Glasgow tenement. *Scott Med J.* 1984;29(4):244-6.
- 157.-Warren SA, Warren KG, Greenhill S, Paterson M. How multiple sclerosis is related to animal illness, stress and diabetes. *Can Med Assoc J.* 1982;126(4):377-382.
- 158.-Beltran I, Molto-Jorda JM, Díaz-Marín C, Martín R, Matías-Guiu J. Analytical epidemiological study of multiple sclerosis in Alcoi. *Rev Neurol* 1998;26(149):67-69.
- 159.-Rohowsky KC, Dowling DC, Stuart D y Cook SD. Canine distemper virus-specific antibodies in multiple sclerosis. *Neurology* 1995;45:1554-1560.
- 160.-Cook SD, Rohowsky-Kochan C, Bansil S, Dowling PC. Evidence for multiple sclerosis as an infectious disease.. *Acta Neurol Scand Suppl* 1995;161:34-42.
- 161.-Summers BA, Appel MJ. Aspects of canine distemper virus and measles virus encephalomyelitis. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 1994;20(6):525-34
- 162.-McStreet GH, Elkunk RB, Latiwonk QI. Investigations of environmental conditions during cluster indicate probable vectors of unknown exogenous agent(s) of multiple sclerosis. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 1992;15(1):75-7.
- 163.-Geeraedts CA, Wilczak N, Van Binnendijk R, De Keyser J. Search for morbillivirus proteins in multiple sclerosis brain tissue. *SourceNeuroreport* 2004;15(1):27-32.

ABREVIATURAS UTILIZADAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
DEPC	Dietil pirocarbonato
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
EM	Esclerosis múltiple
F	Proteína de fusión
FDA	Administración de drogas y alimentos; (<i>Food and Drug Administration</i>)
g	gramos
G	Gravedades
H	Proteína hemaglutinina
h	Hora
HeLa	Línea celular de origen humano, Henrietta Lacks
HLA	Antígeno leucocitario humano; (<i>Human leukocyte antigen</i>)
Il-1β	Interleucina 1β
IL-6	Interleucina 6
INFγ	Interferón γ
IRM	Imagen de resonancia magnética
kb	Kilobase
kg	Kilogramo
L	Litro
LCR	Líquido cefalorraquídeo
M	Proteína matriz
m	Minuto
MBP	Proteína básica de la mielina; (<i>Mielin basic protein</i>)
MDCK	Línea celular proveniente de riñón canino; (<i>Madin-Darby canine kidney</i>)
MEM	Medio mínimo esencial; (<i>Minimum essential medium</i>)
mg	Miligramo

µg	Microgramo
MHC II	Complejo principal de histocompatibilidad clase II; (<i>Major histocompatibility complex II</i>)
ml	Mililitro
µl	Microlitro
mM	Milimolar
MOG	Glicoproteína de la mielina del oligodendrocito (<i>Myelin oligodendrocyte glycoprotein</i>)
N	Normal
NP	Nucleoproteína
ng	Nanogramo
P	Fosfoproteína
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos (<i>Phosphate buffer solution</i>)
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa; (<i>Polimerase chain reaction</i>)
PLP	Proteína proteolipídica; (<i>Proteolipid protein</i>)
RT-PCR	Transcripción reversa reacción en cadena de la polimerasa; (<i>Reverse transcription - polymerase chain reaction</i>)
s	Segundo
SLAM	Molécula de señalización de activación de linfocitos; (<i>Signaling lymphocyte activation molecule</i>)
SNC	Sistema nervioso central
TNFα	Factor de necrosis tumoral alfa; (<i>Tumor Necrosis Factor α</i>)
U	Unidades
Vero	Línea celular de riñón de mono verde africano
VMC	Virus de moquillo canino
VS	Virus de sarampión

11. ANEXO DE PREPARACIÓN DE SOLUCIONES

AGUA CON DEPC

Disolver 100 µl de DEPC en 100 ml de agua tridestilada, para tener una concentración de 0.1%.

Incubar 12 horas en baño María a 37°C.

Inactivar la solución con DEPC en autoclave 15 minutos, 20 libras.

ETANOL AL 75%

Disolver 75 ml de etanol en 25 ml de agua con DEPC.

MEM.

Solubilizar 9.61 g de MEM en polvo en 1 L de agua tridestilada.

Agregar 100 000 U de penicilina.

Esterilizar por filtración con membrana de 0.2 micras.

Alicuotar 100 ml y modificar el pH con bicarbonato de sodio en solución al 8% hasta alcanzar un pH neutro.

Si es necesario puede agregarse glutamina alcanzando una concentración final de 2 mM en cada alicuota de 100 ml y 0.1 mM de piruvato de sodio.

ÁCIDO ACÉTICO 5 N.

Disolver 5 ml de ácido acético glacial en 12.4 ml de agua con DEPC.

SOLUCIÓN AMORTIGUADORA DE FOSFATOS (PBS) pH 7.2.

Disolver en 900 ml de agua tridestilada.

Cloruro de sodio (NaCl): 8.5 g

Fosfato de sodio dibásico anhidro (Na₂ HPO₄): 1.1 g

Fosfato de sodio monobásico (NaH₂PO₄): 0.32 G

Ajustar el pH a 7.2

Aforar a 1 L.

Esterilizar en autoclave.

EDTA (Ácido etilendiamino tetracético) 0.5 M pH 8.0

Disolver en 100 ml:

37.22 g de EDTA.

4 g de NaOH.

Ajustar pH a 8.0

Aforar a 200 ml y agitar con bala magnética hasta lograr su disolución.

Esterilizar en autoclave.

ACETATO DE SODIO 2 M pH 5.2

Disolver 27.22 g en 50 ml de agua con DEPC.

Ajustar pH con ácido acético glacial a 5.2.

Aforar a 100 ml.

Esterilizar en autoclave.

MEZCLA PARA MUESTRAS DE ARN

En 2.5 ml de agua con DEPC disolver:

Formol 5 μ l

Formamida 5 μ l

Mops 10X 5 μ l

MOPS (Ácido morfolino propanosulfónico) 1M

Disolver 209.3 g de MOPS en 600 ml agua con DEPC.

Ajustar pH a 7.0

Aforar a 1 L.

Esterilizar por filtración con membrana de 0.2 micras

MOPS 10X

Disolver en 53 ml de agua DEPC

40 ml de MOPS 1M pH 7.0

5 ml de acetato de sodio 2 M pH 5.2

2 ml de EDTA 0.5 M pH 8.0

MOPS 1X

Disolver 100 ml de MOPS 10 X en 900 ml de agua DEPC.

AMORTIGUADOR DE CARGA

1mM EDTA pH 8.0

0.25% azul de bromofenol

0.25% de xileno cianol.

50% glicerol

TAE 50X (Tris acetato EDTA)

242 g de Tris

57.1 ml de ácido acético glacial

100 ml de EDTA 0.5 M pH 8.0

TAE 1X

Disolver una parte de TAE 50X en 49 partes de agua.

REFERENCIAS

Ausbel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, et al editores. Currents Protocols in Molecular Biology. EUA: Wiley, 2001.

Sambrook, J *et al.* Molecular Cloning. Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory.1989.

12. ANEXO DE FORMATOS

México D.F. a _____ de _____ de 200_____.

PMVZ Miriam Edith Amaro Lara. Tesista de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM.

Asesores:

Dra. Sandra Quiñones Aguilar. Neuróloga de adultos. Esclerosis Múltiple Asociación Civil. EMAC

Dr. Francisco Javier Basurto Alcántara. Prof. de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México UNAM.

Dr. Samuel Genaro Jardón Herrera. Prof. de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México UNAM.

CONSENTIMIENTO INFORMADO.

Se me informa de la realización del estudio denominado **“IDENTIFICACIÓN DEL VIRUS DE MOQUILLO CANINO EN MUESTRAS SANGUÍNEAS DE PACIENTES CON ESCLEROSIS MÚLTIPLE”**, que tiene como objetivo determinar la probable asociación entre este virus y la enfermedad en humanos.

Yo _____ acepto de manera voluntaria otorgar una muestra sanguínea de 7mL pudiendo retirar mi consentimiento en cualquier momento.

La toma de muestra estará bajo la supervisión de la Dra. Sandra Quiñones Aguilar y será procesada por la PMVZ Miriam Edith Amaro Lara.

Al momento de la punción se puede producir dolor leve o generarse pequeños hematomas. Estas molestias son reversibles y no requieren de tratamiento especial.

Existirá confidencialidad en el proceso y obtención de resultados; además de que se me mantendrá informado conforme avance la investigación.

_____ Nombre del paciente	_____ Firma
_____ Dra. Sandra Quiñones Aguilar	_____ Firma

Para mantenerse informado comunicarse con PMVZ Miriam Edith Amaro Lara:

amarole@hotmail.comT, amarole@gmail.com

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM. Departamento de Microbiología e Inmunología. Laboratorio de Microbiología Molecular. 56225897 Ext. 26

Dra Sandra Quiñones Aguilar. Esclerosis Múltiple Asociación Civil EMAC. Tel 55 30 11 30.

Formato 1. Consentimiento informado.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
TESIS "IDENTIFICACIÓN DEL VIRUS DE MOQUILLO CANINO EN
MUESTRAS SANGUÍNEAS DE PACIENTES CON ESCLEROSIS MÚLTIPLE"

NOMBRE _____

EDAD _____ SEXO _____ TELÉFONO _____

1.- ¿Algún familiar ha tenido alguna enfermedad neurológica?

SI NO

NOMBRE DE LA ENFERMEDAD _____

PARENTESCO CON USTED _____

2.- ¿Usted ha padecido de sarampión?

SI NO

HACE CUÁNTO TIEMPO _____

3.- ¿Fue vacunado en el 2006?

SI NO

CONTRA CUÁL ENFERMEDAD _____

4.- Ha tenido mascota:

a) PERRO b) HURÓN c) OTRA ESPECIE d) NO HE TENIDO
MASCOTA

5.- De las especies anteriores ¿Fueron vacunados contra moquillo canino?

a) SI b) NO c) NO LO SE

6.- ¿En qué lugares habita regularmente su animal de compañía? Puede marcar más de una opción.

a) DENTRO DE CASA b) PATIO c) AZOTEA d) CALLE

7.- ¿Su animal de compañía tiene contacto con otros perros o hurones ajenos a los de casa?

a) SI b) NO c) NO LO SÉ

8.- Comentarios y observaciones que desee realizar:

Formato 2. Cuestionario