

1992-A

CODIGO: 084776629

Universidad de Guadalajara

División de Ciencias Biológicas



ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO DE LA CORTEZA SENSORIMOTORA DE CERDOS INFECTADOS CON VIRUS DEL S. O. A.

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

LICENCIADO EN BIOLOGIA

P R E S E N T A

MA. DE LOURDES LOMELI JAUREGUI

GUADALAJARA, JAL. AGOSTO DE 1994



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Expediente
Número
Sección541/93.....

C. MA. DE LOURDES LOMELI JARDREGUI
PRESENTE. -

Manifiesto a usted, que con esta fecha ha sido aprobado el tema de tesis "ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO DE LA CORTEZA SENSORIMOTORA DE CERDOS INFECTADOS CON VIRUS DEL S.O.A." para -- obtener la Licenciatura en Biología.

Al mismo tiempo el informo que ha sido accepta do como Director de dicha tesis el M.V.Z. Mario Alberto Ramírez-Herrera.

A T E N T A M E N T E
"PIENSA Y TRABAJA"
Guadalajara, Jal., 23 de Junio de 1993
EL SECRETARIO
ENCARGADO DEL DESPACHO DE LA DIRECCION



FACULTAD DE
CIENCIAS BIOLÓGICAS

BIOL. JESUS ALBERTO RAMÍREZ ARIAS

c.c.p.- El M.V.Z. Mario Alberto Ramírez Herrera, Director de Tesis
c.c.p.- El expediente del alumno

JAEA/cgjr.

Al contestar este oficio, dígame fecha y número

DR. FERNANDO ALFARO BUSTAMANTE
Director de la facultad de Ciencias Biológicas
de la Universidad de Guadalajara

PRESENTE.

Por medio de la presente, nos permitimos informar a Usted, que habiendo revisado el trabajo de tesis que realizó la pasante **MA. DE LOURDES LOMELI JAUREGUI** código número **084778629** con el título **ESTUDIO HISTOPATOLOGICO DE LA CORTEZA SENSORIMOTORA DE CERDOS INFECTADOS CON EL VIRUS DEL S.O.A.** consideramos que reúne los méritos necesarios para la impresión de la misma y la realización de los exámenes profesionales respectivos

Comunicamos lo anterior para los fines a que haya lugar.

ATENTAMENTE

Guadalajara, Jal. a 29 de Junio de 1994

EL DIRECTOR DE TESIS



SINODALES

- 1.- P. M. en C. MARISELA MENDOZA
- 2.- DR. OSWALDO PALACIOS RIVERA
- 3.- DR. HUGO CASTAÑEDA VAZQUEZ

FIRMAS



Este trabajo fue realizado en el Area de Investigación Científica de la Facultad de Ciencias Biológicas y en el Laboratorio de Investigaciones en Inmunología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Guadalajara. Así mismo en el Laboratorio de estructura celular de la División de Patología del Centro de Investigaciones Biomédicas de Occidente del Instituto Mexicano del Seguro Social que dio facilidades para la parte fotográfica.

Director de tesis: Mario A. Ramírez Herrera .

DEDICATORIAS

A JOSE DAVID, ESPOSO, AMIGO, AMOR Y CARACTER DE MI FAMILIA Y A MI HIJO, DAVIS, POR EL AMOR Y APOYO QUE SIEMPRE ME HAN BRINDADO Y QUE ME HA MOTIVADO PARA SALIR ADELANTE.

A MIS PADRES: MA. DE JESUS Y LORENZO QUIENES ME HAN DADO LO MEJOR DE SUS VIDAS.

A MIS HERMANOS: CARMEN, GABRIELA, RICARDO, OCTAVIO, ALEJANDRA, ANITA Y YAKCELY POR SU APOYO Y AMISTAD.

AGRADECIMIENTOS

A LA UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

**A MARIO RAMIREZ HERRERA Y A MARIA
LUISA MENDOZA POR HABER APOYADO
PARA LA REALIZACION DE LA PRESENTE.**

**A OFASE Y A PANFILO CONTLA
MUÑOZ POR SU DISPOSICION PARA LA
REALIZACION DE ESTE TRABAJO.**

INDICE

CONTENIDO	PAGINAS
RESUMEN	viii
INTRODUCCION	1
ANTECEDENTES	3
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	8
HIPOTESIS	9
OBJETIVOS	10
MATERIAL Y METODOS	11
DIAGRAMA DE FLUJO	16
RESULTADOS	17
DISCUSION	32
CONCLUSIONES	35
BIBLIOGRAFIA	36

RESUMEN

El síndrome del ojo azul es una enfermedad que se presenta en cerdos, la cual provoca daños al sistema nervioso, respiratorio y reproductivo, provocando una morbilidad del 20 al 50% y una mortalidad del 87 al 99%. A principios de 1980 se observó por primera vez en granjas porcícolas de La Piedad, Michoacán y hasta la fecha se ha diagnosticado en doce estados de la república. El agente causal es un virus de morfología similar a los paramixovirus, con un tamaño aproximado de 165 nm, con proyecciones cortas en la periferia y distribución homogénea que corresponden a proteínas que muestran actividad hemaglutinante, actividad hemolítica y de neuraminidasa, es sensible a solventes orgánicos y produce efecto citopático. Serológicamente no se relaciona con otros paramixovirus conocidos. Los daños que ocasiona este virus en corteza cerebral se estudiaron utilizando seis lechones infectados y tres clínicamente sanos, los cuales fueron perfundidos para hacer el estudio histopatológico de la corteza cerebral; utilizando las tinciones de hematoxilina-eosina, Klüver Barrera y Vog, se observó pérdida casi total de la laminación, gliosis, cromatolisis, degeneración de las células

piramidales gigantes, *status spongiosus*, incremento en el espacio de Virchow Robin, neuronofagia, retracción celular, cariolisis, hipercromasia nuclear y necrosis. Con el método de inmunoperoxidasa se localizó la reacción antígeno-anticuerpo en neuronas de corteza cerebral y cerebelo de cerdo infectado, los anticuerpos de cerdos convalescientes parecen ser capaces de discriminar células no infectadas de las infectadas, presentándose en las neuronas que sufren la infección, como son las células piramidales de corteza cerebral y células de Purkinje en cerebelo. Aparentemente en las células granulares y gliales no se presenta esta reacción, lo que sugiere que el virus del síndrome del ojo azul podría afectar de manera selectiva ciertas células del sistema nervioso central.

INTRODUCCION

La porcicultura mexicana se desarrolló en granjas explotadas intensivamente a partir de los años 50s, teniendo como limitante desde sus inicios la aplicación de programas técnicos para el control sanitario de procesos infecciosos en los hatos. Existen regiones que son afectadas por enfermedades infecto-contagiosas de los cerdos como: gastroenteritis transmisible (GET), influenza, enfermedad de Aujeszky (EA), cólera porcino (CP), encefalitis hemaglutinante (EH) y rabia, las cuales repercuten económicamente a la porcicultura nacional. Otra enfermedad descrita a principios de 1980 es el Síndrome del Ojo Azul (SOA) el cual se ha detectado en doce estados de la república. El principal foco de infección se localiza en la región de La Piedad, Michoacán (1, 2-4).

Existe evidencia del aislamiento de un virus porcino en Japón realizado por Sasahara y col., en 1954 y se designó como HVJE, el cual producía

signos respiratorios, neurológicos y reproductivos similares al SOA, sin embargo no se han comparado ambos aislamientos (citado por Hernández, J. P. y Col. 5).

Los síntomas del SOA se caracterizan por letargia, depresión, anorexia, edema palpebral, secreción nasal, diarrea, estertores, lordosis, pelo erizado, constipación, conjuntivitis, secreción purulenta ocular, ceguera y opacidad de la córnea. Los signos nerviosos son progresivos e inician con incoordinación, tortícolis, temores, nistagmus, midriasis, marcha en círculos, opistótonos, rigidez de miembros, espasmos musculares, hiperexcitabilidad, pedaleo, parálisis posterior, postración, hipotermia y muerte. Sólo del 1 al 10% de los cerdos desarrollan opacidad de la córnea. Los cerdos mayores de 30 días ocasionalmente muestran signos clínicos o mueren, sin embargo, ocurre opacidad de la córnea (2-3,6).

ANTECEDENTES

En los cerdos existen una gran variedad de enfermedades virales que afectan su sistema nervioso central tales como :

La Enfermedad de Aujeszky.- La afección del S.N.C. se acompaña de la congestión de meninges, acumulación de líquido cefaloraquídeo (7), ganglioneuritis, necrosis glial, tanto en la sustancia gris como en la blanca, las lesiones son más pronunciadas en la sección frontal y temporal; por exámen microscópico se descubren daños en neuronas, médula espinal y cerebelo, lesiones perivasculares con necrosis focal. La necrosis neuronal es extensa (8-9).

Cólera Porcino (fiebre porcina clásica).- Se caracteriza por encefalitis, algunas lesiones en el cerebro con infiltración linfocitaria perivascular, proliferación endotelial y microgliosis. Estos daños ocurren con gran frecuencia en el tálamo y médula (9).

Rabia.- El sistema nervioso muestra encefalitis difusa, lesiones ganglionares

y celulares. La encefalitis rábica, a diferentes niveles del neuroeje muestra una marcada hiperemia seguida de diapedesis y formación de nódulos perivasculares, llamado "foco encefálico". Los cuerpos de Negri, se han encontrado con mayor frecuencia en las células piramidales de la corteza, en las de Purkinje, en la protuberancia y con menos frecuencia en la médula espinal y los ganglios, la córnea, las suprarrenales y otros órganos (10).

Encefalitis Hemaqlutinante. - Provoca una encefalitis no supurativa con tumefacción perivascular y degeneración neural de la cuerda espinal y del cerebro (8,9).

En el caso del SOA desde el punto de vista histopatológico las alteraciones fundamentales que se han reportado son: meningoencefalitis no supurativa, con infiltración linfocitaria perivascular, gliosis y necrosis, neuronofagia, necrosis neuronal y glial, meningitis y coroiditis. Las áreas más afectadas son el tálamo, cerebro medio y corteza cerebral. En los pulmones hay neumonía intersticial con proliferación de células mononucleares y abundantes leucocitos (11,4,2).

Experimentalmente en cerdos de un día de edad, inoculados con el VSOA, el daño se observa casi exclusivamente en el cerebelo, en la capa molecular y se relaciona con la degeneración neuronal y axonal, necrosis neuronal y gliosis focal. También se observan focos de infiltración por células mononucleares en meninges e inclusiones intracitoplasmáticas en células de Purkinje (4).

Ocurre amigdalitis moderada con descamación del epitelio y células inflamatorias en las criptas. En el ojo ocurre uveítis anterior, infiltración de células mononucleares y neutrófilos en la unión esclerocorneal, en el ángulo iridocorneal, en el iris o en el nervio óptico. En la córnea se observa una capa de macrófagos y neutrófilos, así como aumento de la vascularización (4,2).

El agente causal del SOA es un virus que se aisló en 1981 y se denominó virus del síndrome del ojo azul (VSOA) (4), mientras al virus aislado en 1984, aparentemente el mismo, se le denominó paramixovirus porcino de La Piedad, Michoacán (PpLPM) (4, 12).

En estudios ultraestructurales se encontraron partículas con morfología similar a los paramixovirus con tamaño aproximadamente de 165nm, con proyecciones cortas en la periferia con distribución homogénea e insertadas en la envoltura lipídica (11, 13-14), tiene actividad hemaglutinante (HA) ante eritrocitos de varias especies animales incluyendo al humano (4, 13-14), es sensible a los solventes orgánicos, posee actividad hemadsorbente, hemolítica y de neuraminidasa, conserva sus propiedades hemaglutinantes e infectantes en células PK-15 por 110 días a 37°C. A 87°C conserva su HA durante 1 minuto y su infectividad por lo menos por 3 minutos. El virus del SOA se replica en una amplia variedad de líneas celulares y en todas las células empleadas el virus

produce efecto citopático. En general induce vacuolización del citoplasma, formación de sincitios, cuerpos de inclusión, células con citoplasma acidófilo, núcleo picnótico, cariorexis, cariolisis, células redondeadas, alargadas y estrelladas (4, 13).

Serológicamente no se relaciona con otros *paramixovirus* conocidos tanto de humanos como de otras especies animales. En estudios de inmunofluorescencia muestra reacción negativa contra conjugados específicos de gastroenteritis transmisible, influenza 3, virus sincitial respiratorio, enfermedad de Aujeszky, encefalitis hemaglutinante y cólera porcino (13-14, 16-17).

Hasta la fecha el cerdo es el único animal infectado en forma natural por el VSOA(4). Esta enfermedad se transmite a los cerdos sanos por aerosoles emitidos por cerdos infectados (4, 12, 14-15). La vía transplacentaria de infección se manifiesta de una manera inmediata con un daño activo (15).

Generalmente se inicia el padecimiento súbitamente después de estrés o enfermedad respiratoria (18). La morbi-mortalidad son variables que dependen principalmente de la edad. La enfermedad se caracteriza por afectar a los lechones menores de 15 días, con menos frecuencia se afectan cerdos destetados, jóvenes o adultos (4).

Se ha reproducido la enfermedad en cerdos susceptibles y el virus aislado

provoca signos similares a los que ocurren en la infección natural (11,2) con excepción de la opacidad de la córnea, además se recuperó el virus a partir de sangre, encéfalo, riñón, amígdala, hígado, pulmón, médula espinal, bazo, ganglios linfáticos, corazón y cornetes nasales (2, 4, 15).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Actualmente el SOA constituye un serio problema de salud animal y requiere de estudio más detallado. Las lesiones en sistema nervioso central asociadas a la infección *in vivo* por el VSOA en cerdos requiere de analizarse utilizando técnicas histológicas e inmunohistoquímicas aplicadas en cortes de corteza cerebral y cerebelo ya que éstos dos órganos tienen funciones en el origen y la modulación del movimiento, respectivamente.

HIPOTESIS

De las células que conforman el tejido del SNC, el virus del SOA afecta de manera selectiva a las neuronas.

OBJETIVOS

Objetivo general

1.-Describir las alteraciones histológicas que se manifiestan en la corteza cerebral y cerebelo del cerdo asociadas a la infección de VSOA e identificar las células infectadas.

Objetivos particulares

1.-Realizar un análisis descriptivo de las lesiones encontradas en la corteza sensorimotora de cerdos infectados en un brote natural, con la utilización de las tinciones de hematoxilina-eosina, Klüver Barrer y Vogt.

2.-Identificar inmunohistoquímicamente con el método de inmunoperoxidasa las células de corteza cerebral y cerebelo que resultan infectadas por VSOA.

MATERIAL Y METODO

Se realizó la detección de brotes de SOA en la región de La Piedad, Michoacán y Tepatitlán, Jalisco.

De las cuatro camadas en que se detectó la enfermedad se sacrificó la mitad de la camada para realizar el diagnóstico diferencial por la técnica de inmunofluorescencia directa, para lo cual se utilizaron anticuerpos marcados contra antígenos de la envoltura del virus de EA (20) y CP (21), las cuales fueron negativas y de éstas camadas se preparó un homogenado de cerebro al 10% en solución amortiguadora de fosfatos con pH 7.2 y 0.1 M, se centrifugó a 10,000 rpm a 4°C durante 20 minutos, para ensayar la técnica de hemaglutinación, en la cual se utilizaron eritrocitos de pollo, ratón y conejo (22); de las muestras que resultaron positivas se inocularon en fibroblastos de embrión de pollo, con el fin de comprobar que el efecto citopático fuera similar al anteriormente descrito para este virus. Los lechones restantes de las camadas afectadas y con los signos clínicos ya descritos en esta enfermedad, fueron procesados para estudio histopatológico. Estos lechones infectados (n=6) así como un grupo de testigos negativos (n=3) procedentes de una granja sin antecedentes de la enfermedad y seronegativos, fueron anestesiados con pontobarbital sódico a una dosis de 22

mg/kg de peso corporal por vía intravenosa(23).

Se practicó toracotomía para iniciar la perfusión intracardiaca para lo cual se introdujo un catéter en el ventrículo izquierdo, se drenó por la aurícula derecha y se pasó una solución amortiguadora Ringer fosfato-bicarbonato con pH 7.2 y 320 mOsm/l, a la cual se le adicionó 1000U de heparina/l y 1g de procaína/l por 5 minutos, enseguida se pasó una solución de paraformaldehído al 2% disuelto en la misma solución amortiguadora y con un pH de 7.2 y 520 mOsm/l durante 10 minutos. Después se realizó craneotomía para extraer el encéfalo completo, se fijó por inmersión en la misma solución de paraformaldehído al 2% durante 24 horas a temperatura ambiente y se colocó en solución amortiguadora de fosfatos 0.1M y pH de 7.2 por 24 horas (24). Una vez fijado se procedió a obtener las muestras para estudio morfológico.

Se localizaron las zonas sensorimotoras macroscópicamente por comparación con los mapas funcionales de corteza cerebral en humanos(25). Se tomó una muestra de tejido de ésta zona de cada hemisferio cerebral, con un grosor de 3 a 5 mm y una superficie de 6 a 7 mm². Del cerebelo se obtuvo una rebanada de 5mm de espesor que abarcó todas las folias. Todas las muestras se deshidrataron en soluciones crecientes de etanol dos veces en cada uno durante 20 minutos, y una vez en etanol absoluto por 30 minutos. El aclaramiento se inició con una mezcla etanol-xilol 1:1 durante 20 minutos y xilol por 20 minutos. Se

incluyó en parafina a 58°C por 1 hora .

Se realizaron cortes en un microtomo American Optical 812. Para la tinción de hematoxilina-eosina (HE) fueron cortes de 4 micras, para la de Klüver Barrera (KB) de 10 micras y para la tinción de Vogt fueron de 6 micras, los procedimientos son de acuerdo a los decritos en la literatura (26).

Una vez terminado el procedimiento se tomaron fotomicrografías en un microscopio Leitz-Wetzlar con película 32 ASA de Kodak y se realizaron impresiones en papel fotográfico. Los hallazgos histopatológicos se describieron en dichas fotografías.

Preparación de sueros hipérimunes de cerdos convalecientes de SOA, para el método de inmunoperoxidasa

Se preparó un homogenado de cerebro normal al 10% (19) en PBS con pH 7.2, se mezcló a una proporción de 1:1 con suero de cerdo infectado y se incubó a 37°C por una hora. Se centrifugó y se separó el sobrenadante. Después el sobrenadante se diluyó 1:10 en PBS y se precipitó con $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ al 40% ajustado a un pH de 7, en una proporción 1:1; se mezcló y se centrifugó a 5000 rpm por 30 minutos eliminando el sobrenadante. El sedimento se resuspendió en agua destilada al volúmen inicial y se volvió a precipitar con $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ a una

proporción 1:1. Se redisolvió y se repitió la última operación 3 veces.

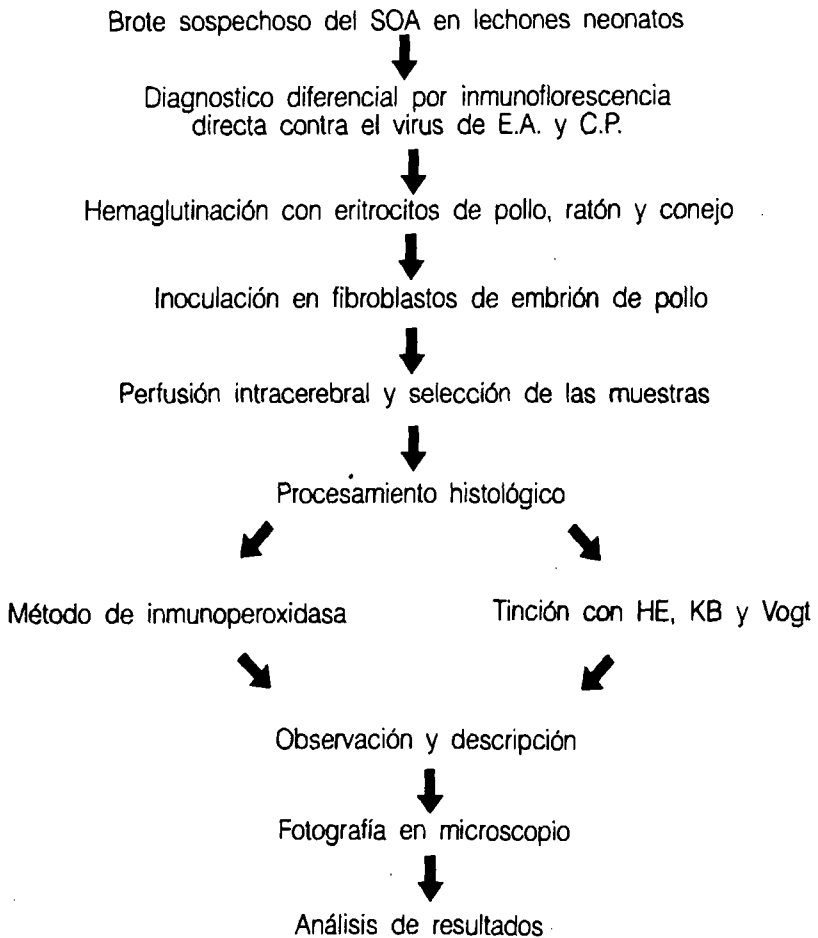
El precipitado se resuspendió en PBS con pH de 7 a 0.1M. Para eliminar el sulfato de amonio, la muestra se dializó, con 1 l de solución salina 0.9% con agitación a 4°C durante 24 horas. Después las muestras fueron almacenadas a -20°C (27).

Método de inmunoperoxidasa

Se hicieron cortes de 6 micras de corteza cerebral y cerebelo se montaron en portaobjetos, después se desparafinaron en dos cambios de xilol por 5 minutos cada uno, rehidratando en etanol absoluto con 3 cambios de 20 inmersiones rápidas, luego se bloqueó la actividad de la peroxidasa endógena con H_2O_2 al 3% en metanol durante 20 minutos, se lavó con agua destilada 3 veces y una en PBS. En seguida se incubó con tripsina al 0.1% en PBS por 30 minutos a 37°C y posteriormente se lavó en agua destilada dos veces y dos veces en PBS. Después se cubrió con suero normal de conejo al 5% en PBS y se incubó a temperatura ambiente en cámara húmeda cerrada por 20 minutos, se decantó el suero, se limpió alrededor del corte y se aplicó el suero inmuoadsorbido de cerdo convalesciente diluido a 1:25 en albúmina bovina sérica al 1% en PBS, incubándose por 18 a 20 horas (incubación nocturna) a temperatura ambiente en cámara húmeda. Luego se lavó con PBS por 5 minutos, tres veces. Se limpió alrededor de los cortes y se aplicó el suero secundario de IgG de conejo anti-IgG de cerdo marcado con peroxidasa diluido 1:100 con solución de albúmina sérica bovina en

PBS incubándose durante 60 minutos a temperatura ambiente en cámara húmeda. Enseguida se lavó en PBS tres veces durante 5 minutos. Después se realizó el inmunorevelado de la siguiente manera: se preparó 9ml de solución bufer Tris, 1ml de $MgCl_2$ al 0.03%, 6mg de DAB (tetrahidrocloruro de diaminobencidina) y 10 μ l de H_2O_2 . Tiñéndolo durante 5 a 10 minutos, lavándose después con PBS dos veces, posteriormente se contratiñó con hematoxilina de Meyer por 10 minutos, en seguida se lavó con agua destilada por 5 minutos. Se viró con hidróxido de amonio a 0.5% de agua destilada. Luego se deshidrató con soluciones crecientes de etanol durante 3 minutos cada uno, aclarando con xilol tres veces por 3 minutos cada uno y por último se montó con resina (28).

DIAGRAMA DE FLUJO



RESULTADOS

El grupo testigo mostró con la tinción HE que la corteza cerebral estaba formada por seis capas; la capa molecular está formada por el neuropilo y en él se encuentran pocas células de Cajal y escasas células estrelladas, la capa granular externa se encontró formada por células pequeñas estrelladas y piramidales, la capa piramidal externa mostró que se forma por células piramidales típicas, las cuales conforme se ubican a mayor profundidad en la corteza incrementan su tamaño, la capa granular interna se conformó básicamente de células estrelladas, la capa piramidal interna contenía células piramidales y piramidales gigantes, intercaladas con células de Martinotti y escasa células estrelladas y la capa multiforme en la cual se observaron células fusiformes y neuronas de diversos tamaños y la laminación de estas capas fue bien definida, lo cual corresponde a la morfología normal y que se observa en la figura 1.

Los hallazgos morfológicos en corteza cerebral de cerdos clínicamente afectados y con diagnóstico diferencial positivo a VSOA, la tinción HE reveló neuronas con núcleos hipercromáticos, así mismo se observó cromatolisis, vacuolización citoplásmica, degeneración de células piramidales gigantes, necrosis, gliosis, neuronofagia, incremento de espacio de Virchow Robin por

retracción celular, el neuropilo mostró *status spongiosus* ampliamente diseminado y se perdió la organización laminar de las capas de la corteza, como se muestran en la figura 2a, b y c.

Con la tinción de KB que permitió distinguir las fibras mielínicas en el grupo testigo de cerdos, se observó que las capas de la corteza cerebral mostraron sus componentes organizados y la laminación ordenada. En el grupo de cerdos infectados, la tinción KB mostró que ocurre desorganización de la capa molecular y el neuropilo con *status spongiosus*, así mismo gliosis y neuronofagia; en la capa granular externa se encontró pérdida de los límites de la capa, muerte de células granulares, incremento del espacio de Virchow Robin, neuronofagia, muerte neuronal y *status spongiosus*, según se observa en la figura 3.

Por otra parte, las fibras mielínicas de la sustancia blanca del grupo testigo de cerdos no infectados mostró que éstas guardaron una relación interfascicular donde las fibras se encontraron alineadas en forma de cordones, los astrocitos y oligodendrocitos formados de tres a cinco células como se observa en la figura 4a; por su parte el grupo de cerdos infectados mostraron *status spongiosus* en las fibras, las células que corresponden a astrocitos y oligodendrocitos mostraron núcleos hipercromáticos y muerte celular, que se muestra en la figura 4b.

La tinción de Vogt con la cual se puede observar la sustancia de Nissl, que representa el retículo endoplásmico rugoso de las neuronas, reveló en las

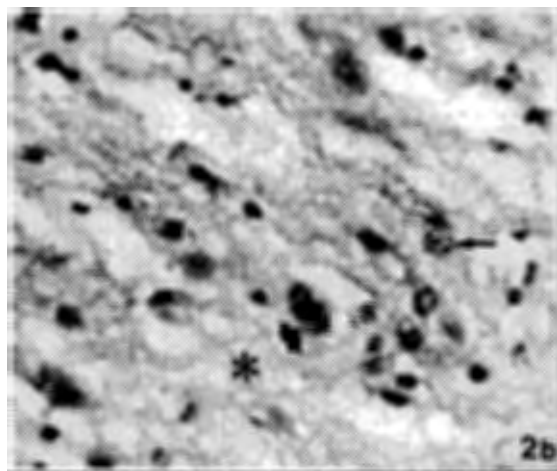
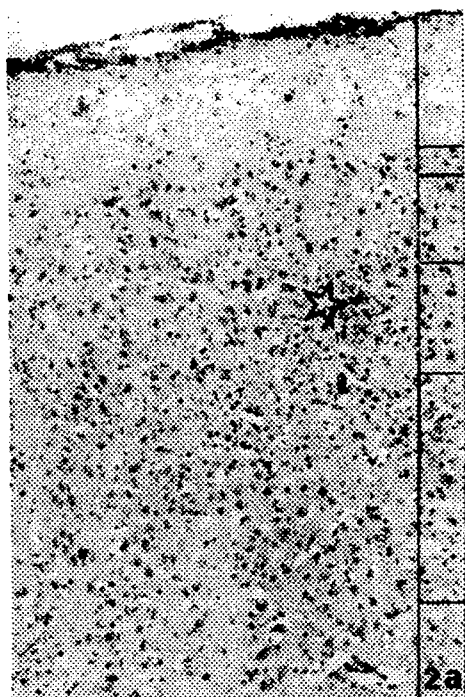
neuronas piramidales de la corteza cerebral del grupo testigo, una distribución homogénea y núcleos de aspecto normal, figura 5a y b. Mientras que en corteza cerebral del grupo de animales infectados, la sustancia de Nissl es finamente granular y dispersa, las neuronas mostraron contornos irregulares y se observaron claras figuras de neuronofagia sobre todo en células con estados degenerativos avanzados como cromatolisis, figura 5c.

Con el método de inmunoperoxidasa en el grupo testigo se observó una ausencia de reacción entre el antígeno y el anticuerpo, ya que no se encuentran partículas del VSOA, no habiendo reconocimiento de c

élulas infectadas, observándose también algunos sitios de precipitación y una ligera reacción de fondo (fig.6). En tejido de corteza cerebral y cerebelo de cerdos infectados se pudo detectar la reacción entre el antígeno y el anticuerpo (color café) observándose las neuronas que sufren la infección, encontrando dicha reacción con menor frecuencia en células granulares y gliales. La reacción, identifica a la células que se encuentran bajo infección con el VSOA sobre todo en las células piramidales gigantes y las células de Purkinje, así mismo se nota que la reacción ocurre tanto en el soma de las neuronas como a lo largo de las dendritas y axones a excepción de las células granulares y gliales que no presentan reacción. Fig. 7a-8b.



Fig.1. Muestra la apariencia normal de la corteza cerebral de un cerdo de 15 días de edad en la cual se distingue la laminación horizontal normal constituida por 6 capas celulares organizadas que son: capa molecular (I), capa granular externa (II), capa piramidal externa (III), capa granular interna (IV), capa piramidal interna (V), y la capa multiforme (VI) 120 X, HE.



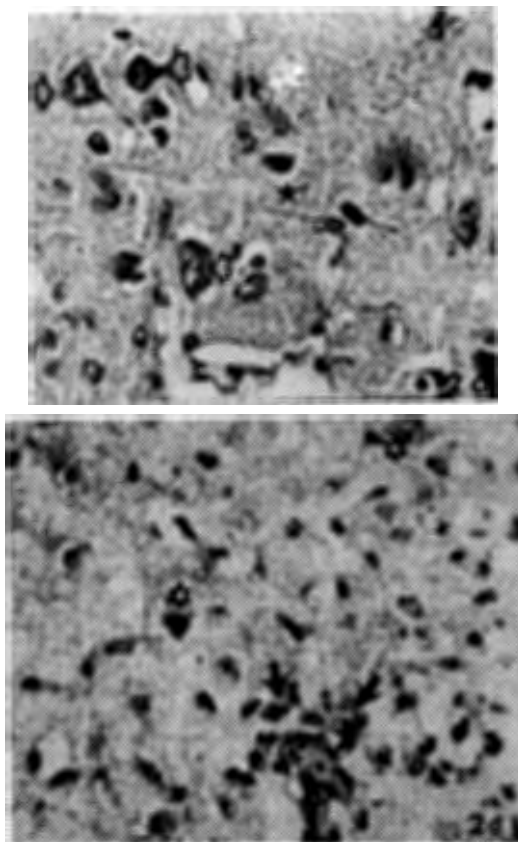


Fig.2a. Esta imagen corresponde a la corteza cerebral en el cerdo infectado en la cual se nota una pérdida casi total de la laminación y una marcada gliosis(☆) 117 X, HE. b.-En esta fotografía se muestran algunas lesiones celulares como cromatolisis (←) degeneración de células piramidales (♣), *status spongiosus* (*), en el grupo infectado 485, X EH. c.- Se muestra el incremento en el espacio Virchow Robin (★), degeneración de células piramidales gigantes (⇔) y núcleos hipercromáticos (∞) en cerdo infectado 497 X, HE. d.-Aquí se muestra la neuronofagia (→) y vacuolización citoplasmática (☆) que ocurre en el tejido infectado principalmente dirigida contra las neuronas muertas 448 X, HE.

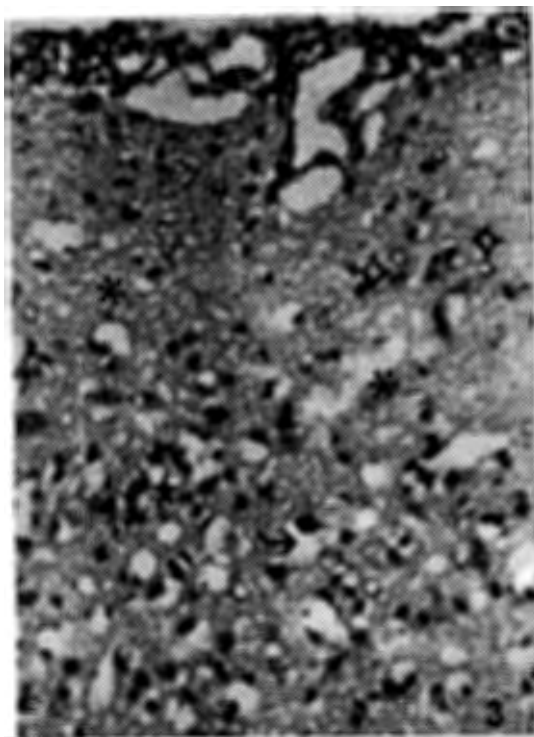


Fig.3. Se observa la corteza cerebral de un cerdo infectado mostrando una pérdida de la laminación y el *status spongiosus* (*) que conserva el tejido infectado, incremento del espacio Virchow Robin (→), gliosis(★) y muerte de células granulares (◇) 220 X, KB.

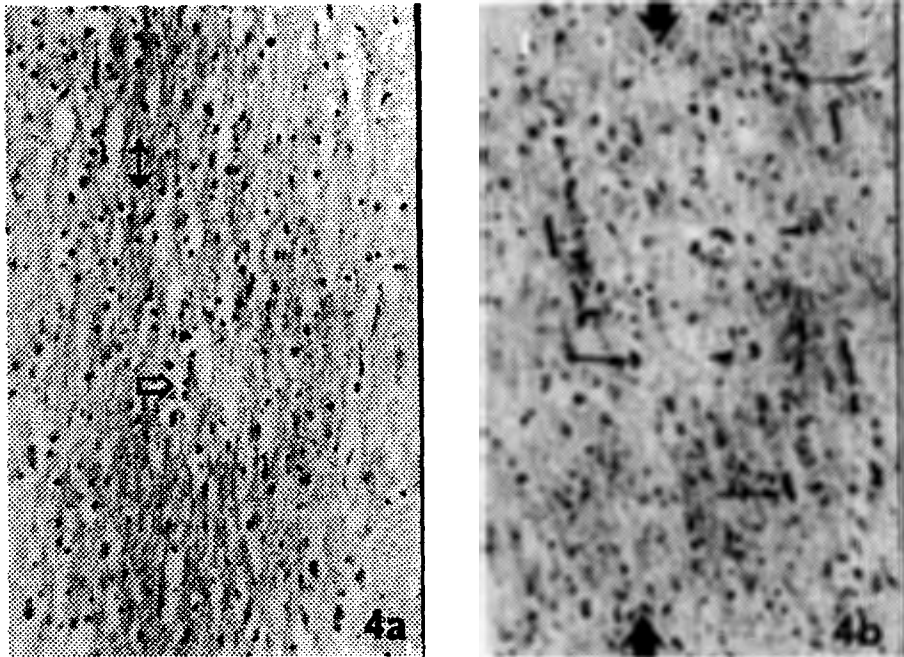
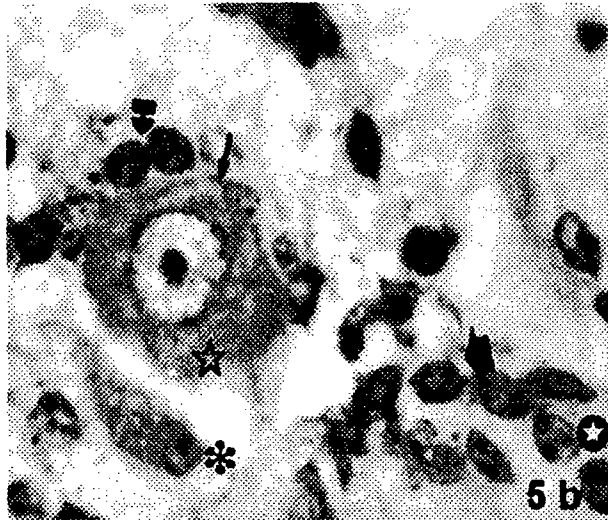
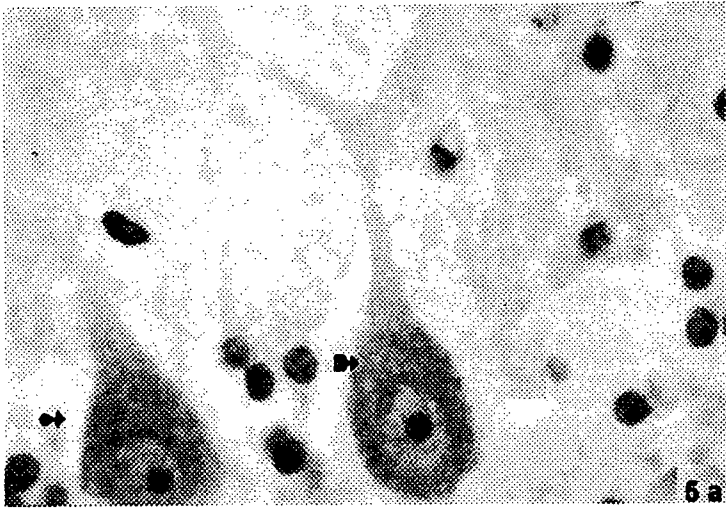


Fig.4a. Aquí se muestra el aspecto normal de la sustancia blanca de la corteza cerebral en la cual las fibras mielínicas conservan su organización interfascicular(↓), los astrocitos y oligodendrocitos aparecen alineados en forma de cordones (⇒) 134 X, KB. b.-Se observa que ocurre una desorganización en la sustancia blanca (◆) y el *status spongiosus* de las fibras mielínicas (➤) perdida de la relación interfascica (→), en el grupo infectado 138 X, KB.



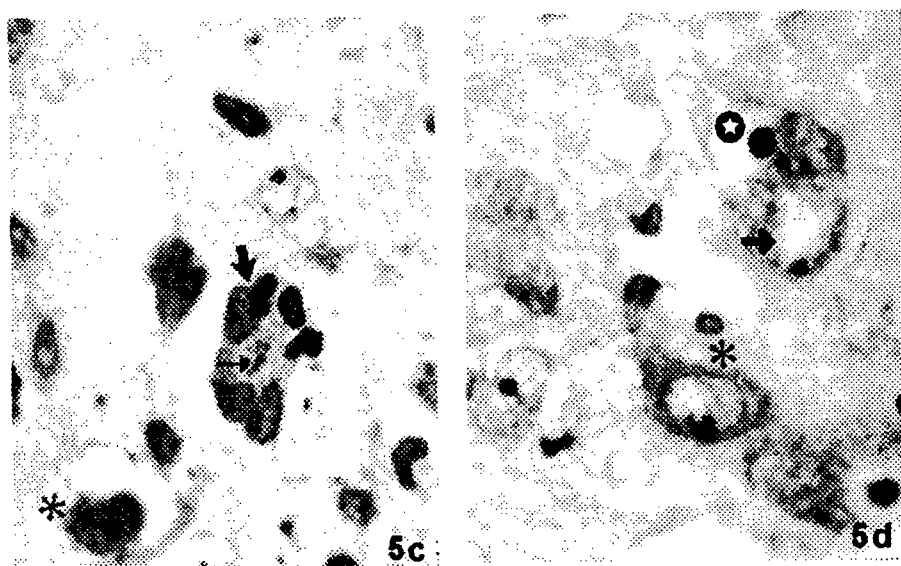


Fig.5a. Se observa la sustancia de Nissl con una distribución homogénea (↔) y contornos regulares en las neuronas (↔), que corresponde al grupo testigo 539 X, Vogt. b.-Muestran éstas neuronas la sustancia de Nissl dispersa (☆), contornos irregulares (→), neuronofagia (↔), retracción celular (↔), gliosis (⊙) y restos celulares(*), en el grupo infectado 585 X, Vogt. c.- Muestra la neuronofagia (↔) que ocurre en una neurona con cromatólisis (→) y neuronas hiper cromáticas (*) en el grupo infectado 588 X, Vogt. d.- Aquí se muestra la sustancia de Nissl con una distribución periférica (↔), gliosis (⊙) y neuronofagia (*) 565 X, Vogt.

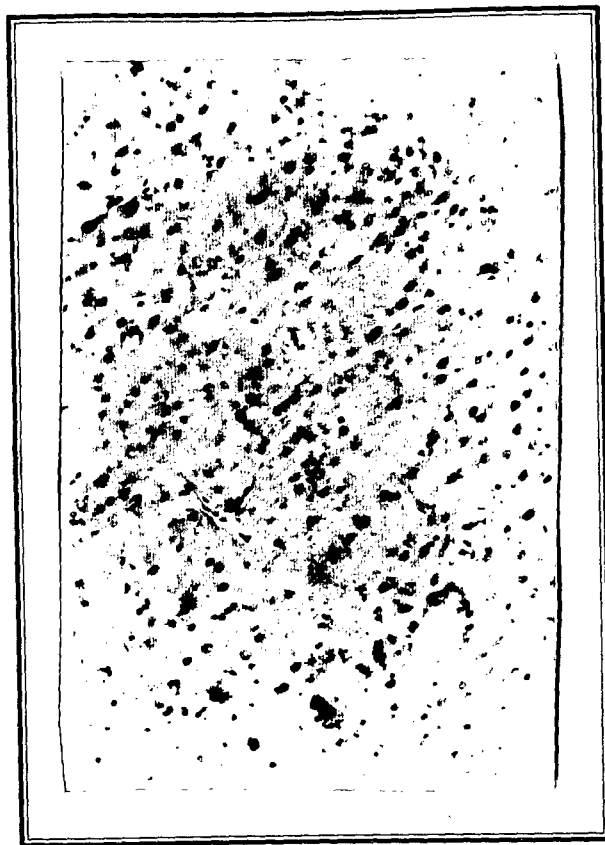


Fig. 6

Fig.6. Se muestra el tejido normal de la corteza cerebral de cerdo no infectado, en el que no presenta reacción entre antígeno y anticuerpo. Método de inmunoperoxidasa. 160x.

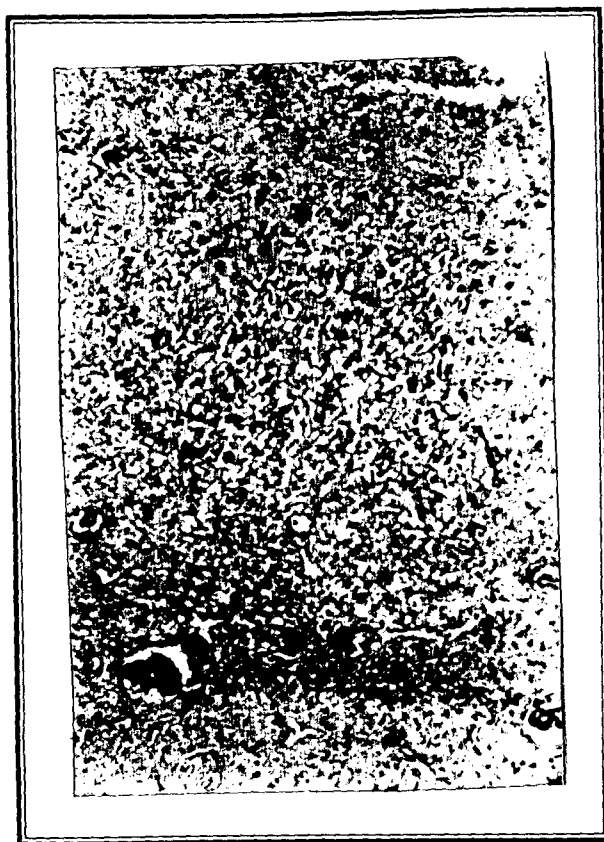


Fig. 7-a

Fig.7a. Esta imagen corresponde a un corte de corteza cerebral de un cerdo infectado en el cual los anticuerpos son capaces de discriminar células infectadas de las no infectadas. 160x.



Fig. 7-b

Fig. 7b.-Se observan unas neuronas piramidales de corteza cerebral de cerdo infectado, mostrando reacción tanto en el cuerpo como en sus ramificaciones y células gliales no infectadas. Método inmunoperoxidasa. 550x.



Fig. 8-a



Fig. 8-b

Fig.8a-b. Cortes de cerebello de cerdo infectado las cuales presentan una reacción positiva entre antígeno y anticuerpo observándose la localización de la reacción, como sucede en las células de Purkinje. Método de inmunoperoxidasa. 160x.

DISCUSION

El SOA se puede confundir con otras enfermedades virales que afectan al sistema nervioso central en el cerdo como son: encefalitis hemaglutinante, fiebre porcina clásica, rabia, Aujeszky y enterovirus porcino debido a que presentan algunos síntomas similares y las cuales se descartan por medio del diagnóstico diferencial, ya que estos virus no presentan hemaglutinina o neuraminidasa. En el caso del parvovirus porcino, que es un virus DNA, tiene signos y actividad hemaglutinante similar al VSOA, pero estos signos se presentan en cerdos adultos y no en lechones de pocos días de nacidos (16-18).

En cuanto a los daños histológicos se observaron lesiones aun no incluidas previamente en la literatura (8, 10, 14, 29-30), como es el caso de la formación de *satatus spongiosus* del neuropilo, lo cual fué un reflejo del daño de las fibras nerviosas y que se produjo en forma diseminada en la corteza cerebral, afectando tanto a la sustancia gris como a la blanca. Esto fué observado utilizando la técnica de KB, en la cual las fibras nerviosas se tiñen de azul y las estructuras de las neuronas de rosa-violeta y la técnica de HE, en la que el núcleo se coloreó de azul-violeta, mientras que las demás estructuras del citoplasma tomaron una

coloración rosada, permitiendo de esta forma distinguir la estructura interna del núcleo, además de la forma y extensión de la célula. Con la pérdida de la relación interfascicular de las fibras de la sustancia blanca se observó que cuando ésta ocurre se presenta una desorganización de los astrocitos y oligodendrocitos los cuales pierden la ubicación en forma de cordones.

Con la utilización de la técnica de Vogt fué posible distinguir la muerte celular en neuronas grandes en las cuales ocurrieron otros cambios importantes como la dispersión de los cuerpos de Nissl lo cual se ha considerado como evidencia de infección viral (16-19). Cuando los cuerpos de Nissl sufren fragmentación y disolución (cromatolisis) las vacuolas aparecen en el citoplasma de las células nerviosas. La pérdida de la morfología de estas células es marcada así como el incremento del espacio de Virchow Robin debido a la retracción de las mismas, lo cual es observado en estados degenerativos por infección.

La gliosis y neuronofagia se consideran cambios debidos a la respuesta del tejido hacia el daño provocado por el virus del SOA a la neuroglia, que es el tejido de sosté

n del tejido nervioso central y está compuesto de células de glia, como son los astrocitos, la oligodendroglia y la microglia, las cuales pueden sufrir cambios similares con la presencia de otros virus como los herpesvirus, coronavirus, parvovirus, iridovirus, togavirus y rabdovirus.

La gliosis en su mayor parte fue observada difusa y la neuronofagia mostró patrones difusos y focales. Si la distribución del agente causal es uniforme en todo el cerebro, la gliosis es difusa. Si en cambio, el punto de la lesión está limitado a áreas localizadas, la gliosis es focal, esto mismo ocurre con la neuronofagia.

La neuronofagia ocurre cuando los cuerpos de las células nerviosas (citones) se empiezan a degenerar, tanto la microglia como la oligodendroglia, migran alrededor de las células afectadas en forma de satélites. Cuando mueren los citones estas células de la glia las fagocitan (32).

Con las tinciones de HE, KB y Vogt se pudo observar daños celulares del VSOA más detallados, mencionados anteriormente y con la técnica de inmunoperoxidasa se localizaron los sitios donde se encontraba el antígeno viral en la corteza cerebral y del cerebelo, observándose en ambos tejidos resultados similares, siendo las células piramidales y las de Purkinje las más afectadas, descartando a las células gliales y granulares ya que en éstas no se observó la reacción de antígeno-anticuerpo (28). Mostrando que probablemente el VSOA podría tener capacidad selectiva de infección en las neuronas del SNC.

CONCLUSIONES

1.-El virus del síndrome del ojo azul produce severas lesiones en la corteza cerebral como cromatolisis, hipercromasia nuclear, homogenización y vacuolización del citoplasma, necrosis, gliosis, neuronofagia, incremento del espacio de Virchow Robin, *status spongiosus*, cariolisis y pérdida casi total de la laminación.

2.-El agente causal del SÓA aparentemente afecta de manera selectiva a las células de la corteza cerebral y cerebelo. Presentándose el daño tanto en el soma como en las dendritas y axones de las células piramidales y de Purkinje, discriminando a las células granulares y gliales.

BIBLIOGRAFIA

- 1.-Marzón, R. J. Estrategias empresariales para la producción porcina moderna. Porcrama 1989; 13: 153-54.
- 2.-Stephano, H. A; Gay, G. M. El síndrome del ojo azul, una nueva enfermedad en cerdos asociada a un paramixovirus. Vet. Méx. , 1986; 17: 102-122.
- 3.-Stephano, H. A. ; Ramírez, T. Ç. ; Flores, A. H. Situación actual del síndrome de encefalitis y opacidad de la córnea como 'Ojo Azul'. Escuela Veterinaria de la Universidad Autónoma de Nuevo León 1983;
- 4.-Martínez, L. A. C. ; Correa, G. P. ; Colinas, T. A. Síndrome de ojo azul producido por el paramixovirus porcino. Proyecto Paramixovirus Porcino LPM. Mex.D.F. 1991; :35-52.
- 5.-Hernández, J. P. ; Sundquist, A. ; Fuentes, M. ; Diaz, O. A. ; Reyes, L. J. ; Moreno, L. J. ; Hernández, B. E. Correlación entre las pruebas de neutralización, inhibición de la hemaglutinación y ELISA en sueros vacunales y de brote para

anticuerpos contra el paramixovirus del Síndrome del ojo azul en cerdos. *Vet. Méx.* 1992; XXIII:3, 1-17

6.-Campos, H. R. ; Carbajal, S. M. Transtornos reproductivos en los sementales de una granja de ciclo completo ante un brote de Ojo Azul. VII Congreso Nacional Asociación Mexicana de Especialistas en cerdos 1989; 62-62.

7.-Mohanty, Dutta. *Virología veterinaria*. Editorial Interamericana. México, D. F. 1988; 203-4.

8.-Taylor, D. J. *Enfermedades del cerdo*. Ed. Manual Moderno 1987; 46.

9.-Leman, A. D. ; Glock, R. D. ; Mengeling, W. L. *Disease of swine*. Fifth edition, Jowastate 1981; 217-19, 228-231.

10.-Bear, G. M. ; Abelseth, M. K. ; Acha, P. N. ; Allen, R. ; Atanasiu, P. ; Cabasso, V. J. ; Clark, H. F. ; Dean, D. J. ; Gregg, M. B. ; Hattwick, M. A. W. ; Hubbard, H. B. ; Kissling, R. E. ; Koprowsky, H. ; Linhart, S. B. ; Sikes, R. K. ; Steele, J. H. ; Sulkin, S. E. ; Thomas, J. B. ; Tierkel, E. S. ; Vaughn, J. B. ; Wiktor, T. J. ; Winkler, W. G. *Rabia epidemiología, diagnóstico, vacunación, prevención, tratamiento en el hombre*. México, D.F. 1982; 142-47.

- 11.-Stephano, H. A. ; Gay, G. M. El síndrome del ojo azul, estudio experimental. Reunión de Investigación Pecuaria en México 1982; 523-28.
- 12.-Galina, P. L. ; Martínez, L. A. ; Correa, G. P. ; Colinas, T. A. ; Anaya, E. A. M. Ramirez NR. Estudio experimental en cerdos de diferentes edades instilados por vías naturales con el paramixovirus porcino de La Piedad, Michoacan (PPLPM). Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco. 1989; 59-61.
- 13.-Martínez, L. A. ; Correa, G. P. ; Fajardo, M. R. ; Garibay, M. Aislamiento y estudio de un virus porcino parecido a los paramixovirus. Avances en enfermedades del cerdo 1985; 313-19.
- 14.-Martínez, L. A. ; Correa, G. P. ; Fajardo, M. R. ; Garibay, S. M. ; Moreno, L. J. ; Ramos, R. I. ; Rosales, F. Virus hemaglutinante similar a los paramixovirus que produce encefalitis y mortalidad en los cerdos. Reunión de Investigación Pecuaria en México 1985: 81.
- 15.-Velasco, S.R. Efecto de la vacuna de pseudorrabia en la enfermedad de "Ojo Azul". VII AMVEC, 1989.
- 16.-Stephano, H. A. ; Gay, G. M. Síndrome del Ojo Azul en cerdos de México. Reunión de Investigaciones Pecuarias en México 1985; 138.

17.-Maldonado, H. A. ; Rosales, E. F. ; Correa, G. P. Vacunación contra la enfermedad de Aujeszky (EA) e investigación de la estimulación de anticuerpos contra EA y contra paramixovirus porcino LPM (Síndrome del Ojo Azul) en cerdas reproductoras. VII AMVEC México-Toluca 1989; 280-2.

18.-Stephano, H. A. Brotes de Encefalitis en cerdos de engorda. Síntesis Porcina 1984; 9-12.

19.-Perez, P. E. ; Flores, C. J. ; Roa, A. F. Impacto en la productividad de una granja lechonera afectada por gastroenteritis transmisible y ojo azul. Universidad Nacional Autónoma de México. Fac. de Medicina Veterinaria y Zootecnia 1989; 195-6.

20.-Hill, H. T. ; Crandell, R. A. ; Kanitz, C. L. ; McAdaragh, J. P. ; Seawright, G. L. ; Solorzano, R. F. ; Stewart, W. C. Recommended minimum standards for diagnostic tests employed in the diagnosis of pseudorabies (Aujeszky's disease). Proceedings Annual Meeting American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians 1977; 375-90.

21.-Stair, E. L. ; Rhodes, M. B. ; Aiken, J. M. ; Underdhal, N. R. ; Young, G. A. A hog cholera virus-fluorescent antibody system. Its potential use in study of embryonic infection. Proc Soc Exp Biol Med 1963; 113: 656.

- 22.-Carbrey, E. A. ; Beard, C. ; Cooper, R. ; Hansen, R. P. ; Pomeroy, B. S. Hemagglutination and hemagglutination-Inhibition Tests with newcastle Disease Virus. Microtiter Technique. Reprints from the 17TH annual Proceedings American Association of Veterinary Diagnosticians, 1974.
- 23.-Meyer, J. Veterinary Pharmacology. Intravenous Anesthetics. Iowa State University press 1977; 383.
- 24.-Feria, V. A. ; Karnovsky, M. J. Preservación óptima del sistema nervioso central por perfusión con glutaraldehído para estudio ultraestructural. Arch. Inv. Méd. (Méx.) 1970; 1: 201-20.
- 25.-Noback, C. R. ; Demarest, R. J. Corteza cerebral, Sistema nervioso en humanos, fundamentos de neurobiología. Mc Graw-Hill Ed. México D.F. 1980; 339-66.
- 26.-Luna, L. G. Manual of Histological Staining Methods of the Armed Forces Institute of Pathology. Third edition, McGraw- Hill Book Company 1968; 16, 37-39, 203-4, 212-13.
- 27.-Margini, R. A. Inmunología e Inmunoquímica. Cuarta edición ED. Panamericana

1989; 672.

28.-Cawley, L. P. ; Minard, B. J. ; Peterson, C. Use of peroxidase-labeled conjugates in clinical immunomicroscopy, in Nakamura RM, Deodhar S(eds); Laboratory Diagnosis of Autoimmune Disorders. Chicago: American Society of Clinical Pathologists, 1976; 179.

29.-Ramírez, T. C. ; Stephano, H. A. Histological central nervous system lesions produced by an hemagglutinating virus in naturally infected piglets. International Pig Veterinary Society Congress, México D.F. 1982; 154.

30.-Stephano, H. A. ; Gay, G. M. ; Ramírez, T. C. ; Maqueda, A. J. An outbreak of encephalitis in piglets produced by an hemagglutinating virus. International Pig Veterinary Society Congress. México D.F. 1982; 153-5.

31.-Cotran, R. S. ; Kumar, V. ; Robbins, S. L. Patología estructural y funcional. Capítulo 19. Cuarta edición. McGraw-Hill. 1990; 1455-74.

32.-Runnells, P. S. ; Monlux, W. S. Principios de Patología Veterinaria, Anatomía Patológica. Ed. CECSA. 1985; 689-93.