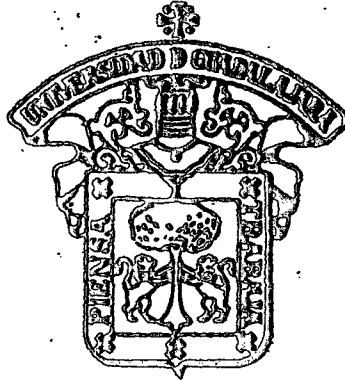


# UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO DEL CEREBELO DE CERDO  
INFECTADO CON EL VIRUS DEL SÍNDROME DE OJO AZUL

TESIS PROFESIONAL  
PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
LICENCIADO EN BIOLOGÍA  
P R E S E N T A  
BEATRIZ HERRERA ALVARADO

D I R E C T O R E S  
M.V.Z. MARIO A. RAMÍREZ HERRERA  
M.V.Z. MARÍA L. MENDOZA MAGAÑA  
GUADALAJARA, JAL. JULIO 1993

A G R A D E C I M I E N T O S :

AGRADEZCO A MIS DIRECTORES :

M.V.Z. MARIO A. RAMIREZ HERRERA,  
M.V.Z. MARIA LUISA MENDOZA MAGAÑA,  
POR LOS CONOCIMIENTOS QUE  
ME TRANSMITIERON.

A MAT. JORGE VASQUEZ PADILLA.  
POR SU VALIOSA COLABORACION  
PARA LA IMPRESION DE ESTE TRABAJO.

DEDICO LA REALIZACION DE ESTE TRABAJO A :

MIS PADRES CON AMOR  
POR TODOS SUS DESVELOS,  
SIMPLEMENTE POR DARME LA VIDA  
Y DEJARME SER.

Ma. TERESA ALVARADO DE HERRERA,  
RAYMUNDO HERRERA BARRIOS.

MIS HERMANOS  
COMO MUESTRA DEL GRAN CARIÑO  
HACIA ELLOS..

Ma. TERESA , RAYMUNDO Y MARCO ANTONIO.

JORGE  
POR TODO TU APOYO ,  
Y POR LO MUCHO QUE SIGNIFICAS  
EN MI VIDA..

FLOR  
PORQUE LOS VERDADEROS AMIGOS  
SON PARA SIEMPRE.

MIS AMIGOS  
POR SU AMISTAD DESINTERESADA.

" ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO DEL CEREBELO DE CERDO INFECTADO CON  
EL VIRUS DEL SÍNDROME DE OJO AZUL".

# I N D I C E

| CONTENIDO . . . . .                     | PAGINA |
|---|--------|
| Introducción . . . . .                  | 1      |
| Antecedentes . . . . .                  | 9      |
| Justificación . . . . .                 | 13     |
| Hipótesis . . . . .                     | 14     |
| Objetivos . . . . .                     | 15     |
| Material y Método . . . . .             | 16     |
| Diagrama de flujo . . . . .             | 20     |
| Resultados . . . . .                    | 21     |
| Discusión . . . . .                     | 25     |
| Conclusiones . . . . .                  | 28     |
| Bibliografía . . . . .                  | 29     |
| Carta de terminación de tesis . . . . . | 34     |
| Carta de aceptación de tesis . . . . .  | 35     |

## INTRODUCCION

Dentro de las explotaciones ganaderas la porcicultura es una de las más importantes en la producción de proteínas de alta calidad. Por lo que es importante el estado de salud del cerdo durante su desarrollo y reproducción, dado que existen enfermedades causadas por una gran variedad de microorganismos; como es el caso de los virus son responsables de varias enfermedades en el cerdo y entre las de mayor importancia encontramos: Cólera Porcino ( Peste Porcina Clásica ) , Enfermedad de Aujeszky, Encefalitis Hemoaglutinante y el recientemente descrito Síndrome de Ojo Azul (SDA). Esta enfermedad se presentó por primera vez en 1980 en México y sólo existen datos de haberse presentado en 1954 en el Japón una enfermedad con similar sintomatología clínica, sin embargo existe poca información debido a que no se continuó su estudio, por lo que no es posible hacer una comparación entre los agentes etiológicos de ambas enfermedades (1,2). En México los brotes iniciaron en la región porcícola de La Piedad Michoacán, diseminándose a otros estados del país, debido a que no se han tomado las medidas sanitarias en la compra-venta y traslados de animales de una granja a otra ( 2,3).

El cerdo es la única especie en la que se ha reportado ésta enfermedad en forma natural, y experimentalmente se han infectado conejo, ratón y embrión de pollo (4).

En hembras gestantes se ha relacionado con mortinatos,

momificación fetal, infertilidad y probablemente aborto (5).

Cuando la enfermedad progresa, en aproximadamente el 10% de los animales afectados se produce opacidad de la córnea (5,6).

#### CARACTERISTICAS FISICAS Y QUIMICAS DEL VIRUS DEL SINDROME DE OJO AZUL (VSOA).

Los estudios sobre ésta enfermedad de los cerdos se iniciaron en 1980 por Stephano y col. los cuales propusieron que la enfermedad era causada por un virus hemoaglutinante identificándolo posteriormente como un probable miembro de la familia Paramyxoviridae y que produce signos nerviosos, respiratorios y opacidad de la córnea (6,7).

Simultáneamente se le atribuyó la enfermedad a la presencia de pesticidas organoclorados en los granos adquiridos en Estados Unidos que se utilizaron en la alimentación porcina (8).

Los estudios que se realizaron posteriormente sobre VSOA fueron desde el punto de vista morfológico donde se describieron partículas virales de 165 nanómetros de diámetro de forma esférica con una envoltura lipídica y proteínas insertadas como espinas con arreglo homogéneo en preparaciones de sobrenadante de cultivo celular con tinción negativa (4,9 10 ).

Mediante electroforesis se han encontrado cuatro proteínas

en su envoltura de las cuales una tiene actividad hemoaglutinante y otra neuraminidasa y dos proteínas más asociadas a la envoltura; la hemoaglutinina es capaz de aglutinar eritrocitos de varias especies de animales y la neuraminidasa produce elución de dicha hemoaglutinación (4,7,10).

Por otra parte se ha detectado resistencia a la actinomicina D ( 9 ) ya que ésta no inhibe su replicación. Es sensible a los solventes orgánicos como éter y cloroformo lo que lo ubica como un virus envuelto (11 ).

#### CARACTERISTICAS BIOLOGICAS: CULTIVO, AISLAMIENTO Y EFECTO CITOPATICO DEL VSOA.

Se propaga en la cavidad alantoidea del embrión de pollo de 8-10 días de edad, causa muerte de los mismos entre los 6-8 días postinoculación y el virus cosechado de líquido alantoideo se puede titular por hemoaglutinación (12).

La inoculación en saco vitelino, produce la muerte de los embriones de 3 a 4 días postinoculación (9); pero el virus solo es titulable por hemoadsorción en cultivo celular infectado con líquido vitelino. En saco amniótico se ha replicado pero también se ha titulado sólo por hemoadsorción ( 10 ).

Por otra parte produce efecto citopático en líneas celulares de riñón de cerdo (PK-15), riñón de Hamster Sirio



(BHK), células Vero, células turbinadas de bovino (TB), el cual se ha descrito como redondeamiento y agregación de células y por lo tanto formación de sincitios por lo que probablemente posee una proteína de fusión similar a otros Paramyxovirus.

En PK-15 se ha descrito la formación de cuerpos de inclusión citoplasmáticos eosinofílicos, sin embargo no se ha encontrado este efecto en otras líneas celulares, ni se ha descrito totalmente su naturaleza (9,10).

En cultivo primario de fibroblastos de embrión de pollo se ha encontrado que produce un efecto similar al anteriormente descrito sin embargo, se propuso que los cuerpos de inclusión podrían no estar constituidos por RNA viral ni virus ensamblados, sino que podrían ser depósito de proteínas virales, cicatriz metabólica o de otra naturaleza (13).

Se ha observado que inmunológicamente no reacciona con conjugados fluorescentes contra otras enfermedades similares en la sintomatología como son Aujeszky, Cólera Porcino y Encefalitis Hemoaglutinante; éstas al igual que el SGA afectan al sistema nervioso central por lo que se ha sugerido que son diferentes antigénicamente (11).

#### HALLAZGOS CLINICOS Y ANATOMOPATOLOGICOS.

Los signos clínicos descritos en lechones afectados son

los siguientes: fiebre, pelo erizado, lordosis, constipación, incoordinación, marcha en círculo, opistótonos, rigidez de miembros posteriores, tremor, postración, nistagmo, midriasis, hiperexcitabilidad, pedaleo, convulsiones tónico-clónicas, hipotermia y muerte (1,7 14).

En hembras preñadas se inicia con estreñimiento ligero o nulo, ligero aumento de temperatura, fetos momificados, reabsorción embrionaria, retorno al estro y baja fertilidad (5,11). En sementales se presenta orquitis y daño testicular con infecciones de VSOA y además se ha detectado actividad hemoaglutinante en el semen ( 15 ).

La inoculación experimental en cerdos produce además de los signos ya descritos, flacidez caudal, exudado nasal, conjuntivitis y edema periorbital, ceguera parcial y muerte principalmente (1, 16). Macroscópicamente se ha observado además opacidad de la córnea, hepatización en el pulmón, ganglios preescapulares y mesentéricos agrandados y congestionados, ganglio submaxilar agrandado, congestión en la mucosa estomacal, médula y pelvícula renal, intestino grueso y delgado, mucosa de la vesícula biliar, meninges y encéfalo, en el riñón además petequias y equimosis, esplenomegalia y hemorragias en surco coronario ( 14 ).

#### HALLAZGOS MICROSCOPICOS.

Los hallazgos histopatológicos descritos son:

infiltración perivascular linfocitaria en el sistema nervioso central, necrosis neuronal, neuronofagia neuronal y glial, y gliosis focal y difusa; en otros órganos como el pulmón se presenta neumonía intersticial localizada, y en el ojo se observa edema corneal con infiltración de células mononucleares y polimorfonucleares (1, 14 16 ).

#### DESCRIPCION ANATOMOFISIOLOGICA DEL CEREBELO.

La importancia del cerebelo radica en las acciones de regulación y coordinación de los movimientos; sincronización corporal, mantenimiento del tono muscular apropiado tanto si esta actividad se realiza en forma automática, refleja o conciente. No es el iniciador del movimiento pero registra el desarrollo dinámico de la extensión y de la tensión del sistema muscular. Así mismo el cerebelo recibe y procesa estímulos aferentes inconscientes de receptores de propiocepción general y receptores exteroceptivos del cuerpo y de los sistemas vestibular, auditivo y visual (17,18).

Las fibras aferentes conducen influencia excitatoria y puede ser reducida por influencia inhibitoria de las células de Purkinje.

Por otra parte morfológicamente el cerebelo muestra tres capas neuronales: una capa externa o molecular con neuronas pequeñas (estrelladas, y en canasta) con fibras

amielínicas; una capa media que conforma los somas de las células de Purkinje y una capa interna con numerosas neuronas granulares pequeñas que muestran de tres a seis dendritas cortas, y un cilindro eje amielínico que asciende a la capa molecular donde se dividen dos ramas externas, además del soma y axón de las células de Golgi (17,19).

En el cerdo el cerebelo es similar a otros mamíferos, sin embargo los cerebros de los cerdos domésticos son 34% más pequeños que el cerdo salvaje ( 20, 21 ).

El patrón neuronal característico de madurez se produce por la proliferación, migración y diferenciación de neuroblastos y está habitualmente completo alrededor de las seis semanas posteriores al nacimiento, pero aún en la edad adulta parece haber cierto grado de actividad neuroblástica. La mielinización del sistema nervioso central se inicia alrededor de los 60 días de gestación y alcanza su máximo al nacimiento y continúa hasta el término del desarrollo del sistema nervioso central ( 20, 21 ).

#### DESCRIPCION DE LOS DAÑOS MORFOLÓGICOS DEL CEREBELO EN CERDOS.

En ésta especie los daños a la corteza cerebelar producidos por VSOA se caracterizan por síntomas vestibulares, específicamente ataxia, dismetría, nistagmo y tremor; la debilidad muscular comúnmente observada con las atonías cerebelares, que resulta de la pérdida de

impulsos del cerebelo a los músculos a través de las fibras eferentes (21).

El cerebelo es particularmente vulnerable tanto prenatal como postnatalmente. El ataque específico contra él está dado por las enfermedades de Teschen, Aujeszky y en la actualidad Síndrome de Ojo Azul. Sin embargo también puede resultar de procesos infecciosos del cuarto ventrículo, meninges, cído medio, al igual que por hernia en el foramen magnum por presión intracraneal, por hidrocefalia o por atrofia hipóxica como ocurre en la esclerosis cortical cerebelar (20).

## ANTECEDENTES

HALLAZGOS ANATOMOPATOLOGICOS MICROSCOPICOS EN OTRAS ENFERMEDADES VIRALES DEL CERDO.

Algunas otras enfermedades que afectan al sistema nervioso central y que son similares en su presentación clínica son la Enfermedades de Aujeszky o Pseudorrabia, Encefalitis Hemoaglutinante, Cólera Porcina (Peste Porcina Clásica ) y Rabia.

En la enfermedad de Aujeszky se han observado lesiones microscópicas en el sistema nervioso central producidos por meningoencefalitis y ganglioneuritis no supurativa difusa, caracterizadas por una marcada infiltración perivascular de células mononucleares y linfocitos. En el cerebelo la meningitis es lo más notable, necrosis neuronal extensa, neuronofagia, gliosis perineural, microgliosis, y se observan cuerpos de inclusión intranucleares acidofílicos adyacentes a la envoltura nuclear de células gliales.

La meningitis se extiende a lo largo del nervio óptico y la esclerótica con cambios intranucleares junto con proliferación linforeticular; se observa gliosis asociada a una degeneración (20,22).

Otra enfermedad que afecta al sistema nervioso central en el cerdo es la Encefalitis Hemoaglutinante; en las lesiones reportadas en cerebelo se han encontrado encefalitis no

supurativa, infiltración perivascular con células mononucleares, formación de nódulos gliales, degeneración neuronal, meningitis y gliosis. Las lesiones más severas se observan en el mesencéfalo, en la médula oblonga y en la médula espinal (20).

La enfermedad viral más común en nuestro país es el cólera porcino y en el sistema nervioso central se han descrito alteraciones como encefalitis, infiltración perivascular proliferación endotelial, y microgliosis hipoplásica del cerebelo; las células gliales muestran proliferación y se ha observado degeneración de células nerviosas y en algunos casos neuronofagia (22). Asimismo se encuentran cuerpos de inclusión intranucleares en células reticuloendoteliales y epiteliales en la vejiga urinaria.

Las manifestaciones en los fetos son el resultado de una infección materna que consiste en momificación y mortinatos (20, 22).

Otra enfermedad que afecta al sistema nervioso central es la rabia, ésta enfermedad manifiesta similitud con otras infecciones virales en el cerdo en cuanto a los cambios que se producen sin embargo es posible que la diferenciación permita encontrar detalles distintivos. Por otra parte se ha encontrado en el cerebelo encefalitis no supurativa, vasculitis moderada, meningitis difusa del cerebelo y médula espinal, leptomeningitis difusa de la folia cerebelar, infiltración perivascular, grandes vasos en la materia gris

y blanca, degeneración neuronal en la médula, destrucción neuronal en el cerebro, manifestada por degeneración de neuronas y células de Purkinje en el cerebelo, fagocitosis de células piramidales y neuronofagia (20). Las afecciones al cerebelo producidas por VSDA, pueden ser enmascaradas por los cambios post-mortem en los animales afectados ya que todos han sido estudiados de cadáveres sin tomar en cuenta dichos cambios, por lo que en éste trabajo se utilizará como una herramienta muy importante la perfusión intracardiaca para evitar que los cambios post-mortem influyan en las alteraciones histológicas. Además se utilizarán técnicas de tinción especiales que nos permitan obtener más datos a partir de las áreas afectadas del cerebelo como son: Vogt, Klöver Barrera y la tinción rutinaria de Hematoxilina y Eosina.

La técnica introducida por Klöver y Barrera en 1953, la cual constituye la base de una serie de técnicas elegidas por muchos investigadores en patologías que involucran al cerebelo; por medio de ésta se diferencia el estado de las fibras mielínicas y la degeneración de las células de Purkinje, observando una coloración azul de la mielina y una coloración rosa/violeta de los productos celulares.

Las anteriores técnicas nos van a ayudar a relacionar los signos y síntomas del VSDA con los cambios histológicos a nivel del cerebelo.



Debido a que es el primer estudio que se realiza se considera un gran apoyo para estudios posteriores.

## JUSTIFICACION

Debido a que los métodos de procesamiento histológicos utilizados para el estudio del VSOA son rutinarios, es necesario realizar un estudio con métodos mas confiables como son, la fijación por perfusión y la aplicación de técnicas de tinción especiales para determinar los cambios producidos en el cerebelo por VSOA.

## HIPOTESIS

El VSDA ocasiona alteraciones hitológicas en el cerebelo, por lo que las manifestaciones clínicas observadas en los animales infectados tienen correlación con ésta y con su magnitud.

## OBJETIVOS

1.- Observar el detalle histopatológico en el cerebelo de cerdo infectado por VSDA fijado por perfusión intracardiaca mediante la utilización de tres métodos de tinción.

a) Tinción con Hematoxilina y Eosina.

b) Tinción con Klüver Barrera.

c) Tinción de Vogt

2.- Realizar un análisis morfológico comparativo para establecer la diferencia con cerdos no infectados.

## MATERIAL Y METODO

Para el presente trabajo se detectaron brotes de la enfermedad en diferentes granjas de la región de La Piedad Michoacán.

Con dos animales de cada camada que presenten signos clínicos del (SDA) se realizó el diagnóstico diferencial, y el resto se procesaron para su estudio.

Diagnóstico Diferencial.- Se efectuó la técnica de hemoaglutinación en placa de 96 pozos utilizando una suspensión de eritrocitos de ratón al 0.5% y solución amortiguadora de fosfatos a, pH 7.2; se hicieron diluciones decrecientes de homogenado de cerebro sospechoso (23).

El diagnóstico diferencial contra Enfermedad de Aujeszky se realizó por inmunofluorescencia en la que se procedió a hacer una impronta en un portaobjetos del tejido sospechoso los que se colocaron en acetona fría a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante diez minutos para su fijación, se agregó el conjugado fluorescente contra el virus de Enfermedad de Aujeszky y se incubó a  $37^{\circ}\text{C}$  durante treinta minutos y enseguida se lavó por dos veces en solución de fosfatos al 0.1 M., pH 7.2 y una vez en agua bidestilada, en ambos casos durante diez minutos; el montaje se hizo con glicerina amortiguada pH 8.5 y se observó bajo un microscopio de epifluorescencia (20).

En el diagnóstico diferencial contra Cólera Porcino por inmunofluorescencia se procedió de la siguiente manera: se realizaron cortes de ganglios linfáticos incluidos en parafina y tripsinizados durante 1 hora a 37° C, a continuación se colocó sobre el tejido el conjugado marcado contra Cólera Porcino y se incubó durante 30 minutos a 37 ° C, el montaje se realizó con glicerina amortiguada a un pH 8.5 para posteriormente observarse bajo un microscopio de epifluorescencia (24).

#### PREPARACION DE MUESTRAS PARA SU ESTUDIO HISTOLOGICO.

De los brotes que resultaron positivos a la hemaglutinación y negativos a la inmunofluorescencia se tomaron 12 lechones enfermos y 4 lechones clínicamente sanos, todos ellos de aproximadamente 15 días de edad, los cuales se anestesiaron con pentobarbital sódico en dosis de 22 mg/kg de peso por vía intravenosa, enseguida se practicó toracotomía para iniciar perfusión intracardiaca, para lo cual se preparó una solución lavadora de Ringer fosfato-bicarbonato con un pH de 7.2 y 320 ml/osmol por litro; se le agregó 1 mg de procaína/litro y 1000 unidades de heparina/litro, ésta solución se introdujo durante 5 minutos con una aguja calibre 18 insertada en el ventrículo izquierdo y se drenó la corriente por la aurícula derecha.

Enseguida se incluyó en una solución fijadora de paraformaldehído al 2% y en una solución Ringer fosfato-bicarbonato durante 15 minutos (25).

Posteriormente se practicó craneotomía para exponer al encéfalo completo y extraerlo intacto el cual se postfijó en la misma solución fijadora durante 24 horas a temperatura ambiente para enseguida mantenerlo con una solución de Ringer fosfato-bicarbonato. Se efectuó la disección del cerebelo y se realizaron cortes sagitales para su estudio histológico, los cuales se procesaron por deshidratación en series crecientes de etanol al 70, 90 y 96% en mezcla de etanol-xilol e infiltración en xilol y una preinclusión en mezcla de xilol paraplast a 58 ° C durante 30 minutos e inclusión en paraplast a 58 ° C durante 1 hora (26).

Se procedió a realizar cortes en un microtomo rotatorio American Optical 820 a 3 espesores: 4, 6 y 8 micras para las tinciones de:

Hematoxilina y Eosina.- Es una tinción rutinaria, la cual utiliza colorantes básicos la hematoxilina y la eosina, se observan los núcleos morados y las sustancias intercelulares naranja ó rosa.

Klöver Barrera .- Donde se utiliza el colorante azul luxol, es una tinción específica para diferenciar la materia gris y blanca y la mielina. Se obtiene una coloración muy limpia de las vainas de mielina en azul ó azul-verde.

Vogt.- En ésta técnica se utiliza simultáneamente (K.B.) un colorante adicional de contraste violeta de cresilo para teñir corpúsculos de Nissl, el núcleo y los corpúsculos de Nissl se tiñen de violeta.

Los métodos de coloración de corpúsculos de Nissl han experimentado en los últimos años un gran avance, debido a la identificación de éstos cuerpos basófilos con el RNA citoplásmico.

De los cortes que se obtuvieron se tomaron fotomicrofotografías de las diferentes áreas del cerebelo, para estudiar los posibles cambios producidos.



## DIAGRAMA DE FLUJO

Detección de brotes naturales  
lechones de aprox. 15 días de edad.

Diagnóstico diferencial

Hemoaglutinación  
con eritrocitos  
de ratón al 0.5%

Inmunofluorescencia  
directa contra  
Cólera Porcino y  
Aujeszky

+ -  
Anestesiar 22mg/kg peso  
pentobarbital intravenoso  
Perfusión intracardíaca con:  
Ringer fosfato-bicarbonato  
pH 7.2 (320ml/osm/l.)  
heparina - procaína  
(sol. lavadora) durante 5 m.  
sol. fijadora de Paraformaldehído  
2% de 15 a 20 m.

Obtención del encéfalo y  
disección del cerebelo

Procesamiento Histológico

Tinción H.E.  
Histopatológico

Tinción K.B.  
mielina

Tinción VOGT  
Corpúsculos de  
Nissl

Fotomicrografías

## RESULTADOS

De las muestras observadas de cerebelo de cerdo infectado por virus del SOA, en la tinción de hematoxilina-eosina (H.E.) se observó que ocurre una persistencia de la capa granular externa (Fig. 2). La capa molecular mostró gliosis, abundantes figuras en migración y migración alterada en forma de columnas de células granulares, (fig 7).

Mientras que en los testigos se observó una capa molecular bien definida y con escasas células en migración (fig 1). Así mismo pérdida de límites entre la capa molecular y granular interna, (fig 4) extensa pérdida de células de Purkinje, (fig. 4) de las cuales las que aún persisten muestran diversos grados de degeneración como cariorrexis, picnosis y cariólisis (fig 4) tumefacción citoplásmica y se dificulta distinguir límites celulares (fig.4), gliosis perineural y neuronofagia (fig.4).

Las células de la capa granular interna mostraron estados degenerativos como cariorrexis, cariólisis y células gliales intercaladas (fig 4).

Por otra parte, en los testigos las células de Purkinje mostraron una apariencia normal, con buena definición entre las capas, sin pérdida de linealidad y límites celulares bien definidos (fig 3) núcleos aparentemente normales y citoplasma normal ( fig 3).

En la sustancia blanca del cerebelo con H. E. reveló que había ocurrido pérdida de la relación interfascicular de

las fibras nerviosas las cuales tienen una apariencia entrelazada dando un aspecto reticular (fig 6).

Mientras en el grupo testigo no se observó ya que conservaron continuidad de las fibras con un aspecto de fina red (fig 5). Así mismo se observaron células que corresponden a oligodendrocitos y astrocitos asociados a fibras nerviosas de la sustancia blanca las cuales en los tejidos infectados se observó un claro desarreglo, además con claros datos de degeneración celular. (fig. 6).

Mientras que en el grupo testigo se observó que éstas células formaban clásicos cordones asociados en grupo de 3 a 5 células que mostraban un aspecto normal (fig 5).

Por otra parte en los animales infectados se notó que la sustancia blanca mostró gliosis y que las células gliales se ubicaron en las cercanías de células dañadas o fibras nerviosas con principios de alteración (fig. 6).

Por otra parte la tinción de Klöver Barrera reveló que la capa molecular mantiene un status spongiosus, (fig 9) con pérdida de linealidad de células de Purkinje, amplios espacios libres de éstas (fig. 9) y evidentes estados degenerativos, (fig. 9), mientras que la dendrita principal y su arborización se mostró aparentemente dañada ya que se veía interrumpida y amplios espacios vacíos de aparentes trayectos del árbol dendrítico (Sin embargo esto debía ser corroborado por impregnaciones argénticas) (fig.9).

Mientras que en los testigos existe una distribución aparentemente normal y continua del árbol dendrítico (fig 8).

Existe una proliferación de células gliales que en los animales testigo no se observa (fig 9), figuras en migración que se presenta en ambos grupos aunque de manera desordenada en los animales infectados (fig. 8 y 9).

Pérdida de continuidad de la capa de células de Purkinje, y las que persisten, muestran evidencias de extenso daño celular. (fig 9).

En la sustancia blanca se notó que las fibras mielínicas sufren degeneración que conduce a la ruptura y disgregación de las mismas ( fig 11).

Mientras que los oligodendrocitos y astrocitos manifestaron estados degenerativos (fig 11).

Por otra parte ésta tinción en el grupo testigo mostró que cuando no existe infección las fibras nerviosas mielínicas se mantienen intactas, la relación interfascicular se conserva y los oligodendrocitos y astocitos aparecen normalmente en cadenas de 3 a 5 células asociadas a las fibras nerviosas y no muestran alteración aparente (fig 10).

Con la tinción de Vogt para corpusculos de Nissl se observó que el citoplasma contenía material finamente granular o reticular pero que no correspondía al aspecto normal de los corpusculos de Nissl (fig 13).

Se observó también pérdida de los límites celulares

(figs. 13 y 14).

Así mismo las células de la capa granular interna mostraron estados degenerativos (fig 14) y neuronofagia (fig. 14).

Mientras que en el grupo testigo se observó un límite celular bien definido, los corpusculos de Nissl se encuentran alineados y con un núcleo normal (fig 12).

En la sustancia blanca del cerebelo, la sustancia de Nissl se localizó en la periferia de los astrocitos y oligodendrocitos y las células mostraron una zona nuclear clara, persisten los cambios degenerativos (fig 16). Aunque en los animales testigo se observó una sustancia de Nissl más homogéneamente distribuída con apariencia de empalizada más densa en la región perinuclear (fig 15).

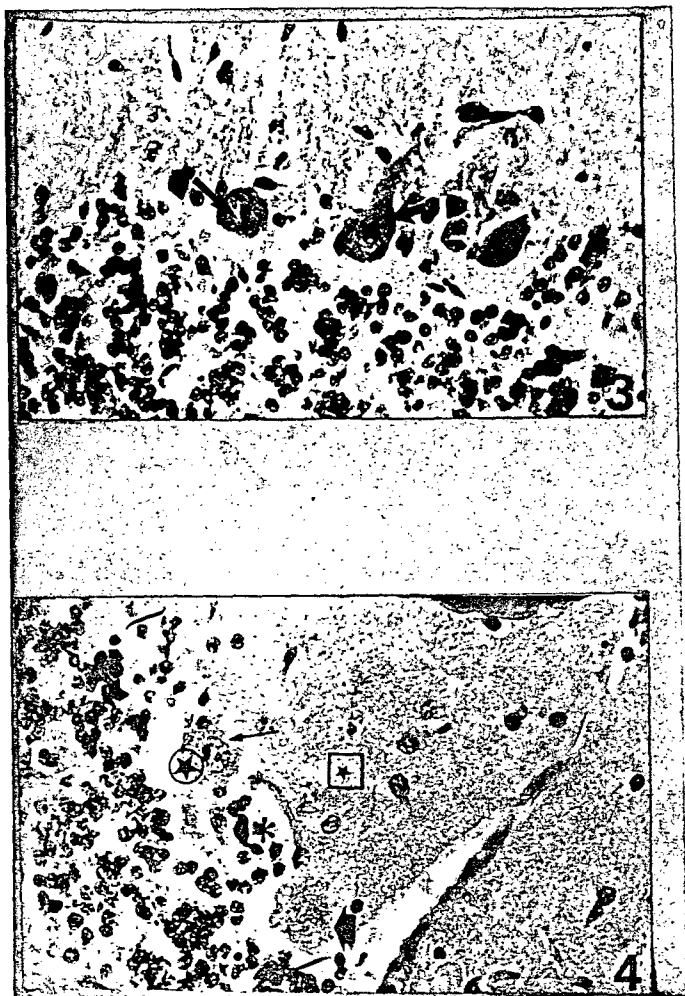
La figura 1 muestra al grupo testigo de 15 días de edad con persistencia de la capa molecular ( → ) y las células de Purkinje de apariencia normal ( tinción de H.E. ). Mientras que en la figura 2 existe persistencia de la capa granular externa ( → ), existe un desarreglo evidente, hay proliferación de células gliales, las células de purkinje en diversos grados de degeneración y muerte ( tinción H.E. )





En el grupo testigo se mostró (fig 3) apariencia normal de las células de purkinje sin pérdida de los límites celulares. ( → ), núcleo y citoplasma normal ( → ). (tinción de H.E.).

Mientras que en el cerebelo de cerdo infectado (fig. 4) donde se dificulta distinguir los límites entre la capa molecular y granular interna ( ) , pérdida de células de Purkinje ( → ), y las que persisten muestran degeneración ( ⊛ ), se dificulta distinguir límites celulares ( → ) y neuronofagia ( \* ). Las células de la capa granular interna mostraron estados degenerativos ( ⊛ ).





Figuras 5 y 6 en la sustancia blanca de cerebelo de cerdo testigo ( fig 5 ) existe una continuidad de las fibras como una red (  ) y los astrocitos y oligodendrocitos formando cordones y de apariencia normal (  ). ( tinción de H.E. ).

















Mientras que en la fig 6 se observó pérdida de la relación entre las fibras nerviosas (  ) y los astrocitos y oligodendrocitos con estados degenerativos (  ), la sustancia blanca mostró gliosis (  ). ( tinción H.E. ).





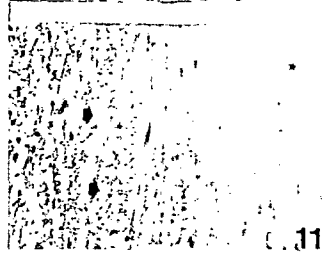
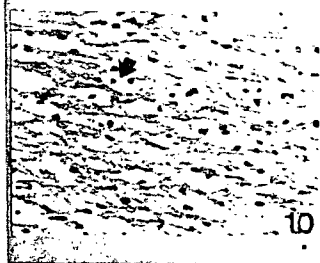
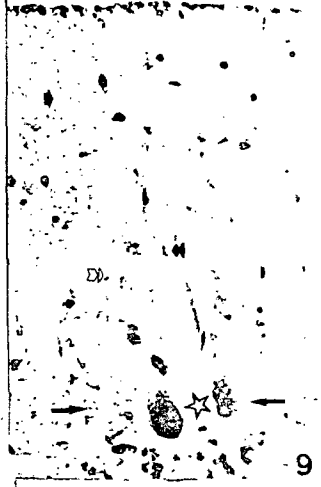
Figura 7 .- El cerebelo de cerdo infectado mostró que en la capa molecular existen abundantes figuras en migración anormal en forma de columnas (  ). (tinción de H.E.).



Figuras 8 y 9.- En el cerebelo del grupo testigo (fig 8) existe una distribución normal del árbol dendrítico (  ) figuras en migración (  ) (tinción K.B.) Mientras que en la (fig 9) con animales infectados, la capa molecular mantiene un status spongiosus (  ), las células de Purkinje se encuentran dispersas (  ) con amplios espacios libres de éstas (   ) y evidentes estados degenerativos (  ). La dendrita principal se observa interrumpida (  ), existe proliferación de células gliales (  ) figuras en migración en forma desordenada (  ) daño de las células de Purkinje (  ).


Figuras 10 y 11.- En los animales testigo (fig 10 ) se observa que la relación entre las fibras se conserva, los astrocitos y oligodendrocitos aparecen normales en cordones de 3 a 5 células (  ) ( tinción K.B.).



Sin embargo en el grupo infectado (fig 11) las fibras de mielina presentan degeneración (  ) al igual que los astrocitos y oligodendrocitos (  ) ( tinción K.B.).






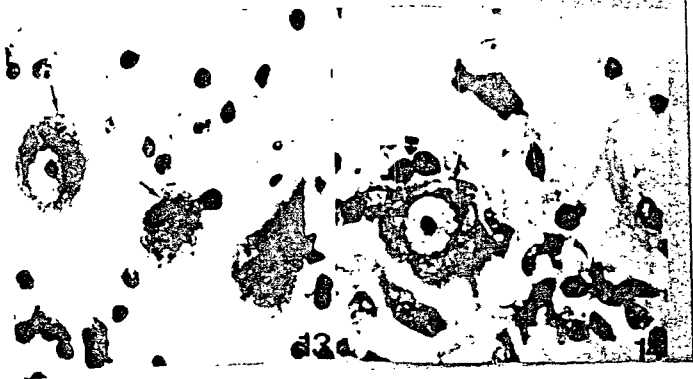


Figuras 12, 13 y 14:


La (fig. 12) muestra las células de Purkinje del grupo testigo un límite celular bien definido, los corpúsculos de Nissl bien alineados y núcleos normales (  ) (tinción Vogt).


Mientras que en la (fig. 13) los animales infectados mostraron un claro desarreglo de los corpúsculos de Nissl (  ), se observa pérdida de los límites celulares (  ) (tinción Vogt).

En la (fig.14) con los animales infectados se observa pérdida de los límites celulares (  ), se distinguen datos degenerativos como gliosis (  ) y neuronofagia (  ) (tinción de Vogt).



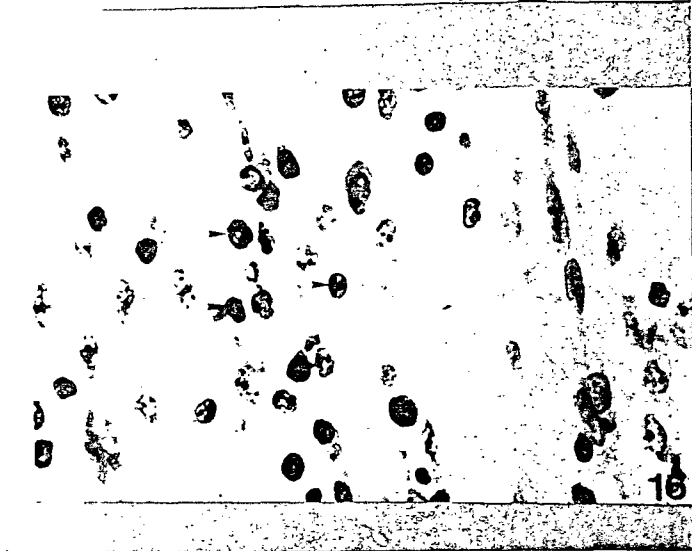
Figuras 15 y 16:

La sustancia blanca en los testigos (fig 15 ) mostró los corpúsculos de Nissl homogéneos y más denso en la región perinuclear, los astrocitos y oligodendrocitos alineados formando grupos de 3 a 5 células (  ) (tinción de Vogt).

Mientras que el grupo infectado (fig 16 ) la sustancia de Nissl se encuentra en la periferia de los astrocitos y oligodendrocitos y con cambios degenerativos (  ) (tinción de Vogt).



15



16

## DISCUSION

Los resultados obtenidos en éste trabajo mostraron que las lesiones que el VSDA provoca en cerebelo de cerdo de 15 días de edad, con la tinción de H.E. se manifiestan por gliosis y status spongiosus en la capa molecular, degeneración de las células de Purkinje (el axón de éstas células es el único que recibe impulsos del cerebelo hacia afuera por lo tanto su función depende de con quién se conecte) con pérdida del límite entre ésta monocapa y la capa granular interna acompañado por gliosis y neuronofagia.

Estas observaciones son similares a lo que han reportado anteriormente en otros trabajos, aunque de manera consistente se ha notado en éste trabajo la ausencia de infiltración linfocitaria perivascular (10,11).

Por otra parte la sustancia blanca de éstos animales mostró pérdida de la relación interfascicular de las fibras nerviosas mielínicas y datos degenerativos de astrocitos y oligodendrocitos, que así mismo se acompañan de gliosis y neuronofagia lo cual no había sido antes mencionado guardando estrecha relación con las alteraciones que, conjuntamente con la degeneración de las células de Purkinje, afectan las funciones del cerebelo como órgano coordinador del movimiento, sincronización corporal y modulador de las funciones propioceptivas y exteroceptivas (17,19).

Tanto la tinción de K.B. como la tinción de Vogt revelaron datos que no se habían reportado como son: desaparición de células de Purkinje lo cual deja espacios vacíos en donde se notó proliferación de células gliales, claros estados degenerativos en las células de Purkinje que también muestran daño en la dendrita principal la que aparentemente se ve interrumpida, sin embargo esto debería corroborarse con técnicas de impregnación argéntica ( 17, 27). La sustancia blanca mostró fibras miélicas discontinuas con amplios espacios vacíos y agrupación y proliferación de células gliales.

Los corpusculos de Nissl también se observaron alterados ya que cambian su organización normal (en forma de empalizada) para aparecer como estructuras granulares en el citoplasma sin orientación definida.

Tanto la perfusión intracardiaca como el empleo de las tinciones de K.B. y Vogt permitieron describir las alteraciones antes mencionadas; ya que la perfusión permite obtener el tejido nervioso con un mínimo de cambios postmortem y una descripción más detallada de las alteraciones histopatológicas. (25, 26, 27 ).

Por otra parte la histopatología de cerdos afectados por el virus de Enfermedad de Aujeszky se diferencia de ésta infección ya que el primero causa aparición de cuerpos de inclusión acidofílicos intracitoplasmáticos en células de Purkinje y una baja proporción de animales infectados

muestran daño cerebelar por el virus de la Enfermedad de Aujeszky, mientras que la mayoría de los animales afectados por VSDA muestran severos daños en cerebelo. ( 21, 22 ).

Por su parte el virus de Encefalitis Hemoaglutinante causa degeneración neuronal y gliosis similar a la provocada por VSDA pero además causa infiltración perivascular de células mononucleares ( 21, 22 ).

El virus de cólera porcino se distingue ya que causa microgliosis hipoplásica del cerebelo y ésto no sucede en VSDA (22).

En el caso del virus por infección rábica se distingue por dañar de manera muy selectiva a neuronas en general en la que causa aparición de los clásicos corpusculos de Negri, que se trata de corpusculos de Nissl alterados pero que adoptan una organización muy típica en ésta infección ( 21 ).

## CONCLUSIONES

1) El Virus del Síndrome de Ojo Azul se diferencia de otras enfermedades víricas del cerdo debido a que mostró detalles histológicos propios de esta patología.

2) Los daños al cerebelo causados por VSOA se relacionan con los síntomas descritos y se concluye que la ataxia, dismetría, e incoordinación entre otras se provocan en gran parte por la degeneración de las células de Purkinje y las fibras miélicas de la sustancia blanca.

3) El emplear en este trabajo la fijación por perfusión intracardiaca reveló mayor claridad al observar los cambios histopatológicos del cerebelo, ya que se evita una degeneración de las células nerviosas provocados por los cambios postmortem.

4) Se comprobó que no es posible definir claramente las alteraciones del cerebelo por VSOA con tan solo una tinción por lo que la utilización de técnicas especiales revelaron otros detalles, que pueden auxiliar al diagnóstico diferencial.

5) Se obtiene un archivo de registro fotográfico que se seguirá enriqueciendo con otros estudios y permitirá un mejor conocimiento de la histopatología y patogénesis de este Síndrome.



## BIBLIOGRAFIA.

- 1.- Stephano, H. A.; Gay, G. M.; (1986) El Síndrome del Ojo Azúl, enfermedad en cerdos asociada a un Paramyxovirus. Vet. Mex. 17: 120-122.
- 2.- Hernández, J. P.; Sundquist, A.; Fuentes, M.; Díaz O. A.; Reyes L. J.; Moreno L. J.; Hernández B. E.; (1992) Correlación entre las pruebas de virus: neutralización, inhibición de la hemoaglutinación y Elisa en sueros vacunales y de brote para anticuerpos contra el Paramyxovirus del síndrome de ojo Azúl en cerdos. Vet. Mex. XXIII. 3. 217-222.
- 3.- Díaz P.P.; Ibarra, P.T.; Maldonado H.P.; Rincon R.F.J.; Rodriguez G.H.; Santillán S.S.; (1989) Correlación clínico patológica del Síndrome de Ojo Azúl (SOA). VII Congreso Nacional Asociación Mexicana de Veterinarios Especialistas en cerdos. 67-68.
- 4.- Stephano, H.A.; Gay, G.M.; (1986) Análisis de cepas del virus del síndrome de ojo Azúl aislados en 12 brotes diferentes de encefalitis y opacidad de la córnea en cerdos. Reunión de Investigadores pecuarios en México. 163.
- 5.- Stephano, H.A.; Gay, G.M.; (1984) Efecto del virus del Síndrome de Ojo Azúl en la reproducción de la cerda. II Congreso Nacional, Asociación Mexicana de Veterinarios Especialistas en cerdos. 83-85.
- 6.- Stephano, H. A.; Ramírez, T. C.; Flores, A. H.; (1983)

Situación Actual del Síndrome de Encefalitis y opacidad de la córnea conocido como "Ojo Azul". Escuela de veterinaria de la Universidad de Nuevo León (curso).

- 7.- Stephano, H. A.; Gay, G. M.; (1982) El Síndrome de Ojo Azul Estudio Experimental. Reunión de investigaciones Pecuarias en México. 523-528.
- 8.- Campos, M.E.; Calderón, S. E.; Solorio, S.; (1982) "The Blue eye syndrome". Síndrome del ojo azul. Pro. of Internacional Pig Veterinary Society Congress México. 171.
- 9.- Moreno, L. J.; Correa, G. P.; Martínez, A.; Ericsson, A.; (1986) Characterization of a Paramyxovirus Isolated from the brain of a piglet in México. Archives of Virology. 9: 221-231.
- 10.- Martínez, L. A.; Correa, G. P.; Fajardo, R. M.; Garibay, M.; (1985) Aislamiento y estudio de un virus porcino parecido a los paramyxovirus. Avances en Enfermedades del cerdo AMVEC. 313-319.
- 11.- Stephano, H. A.; Gay, G.M.; (1985) Síndrome del Ojo Azul en cerdos en México. Reunión de Investigaciones Pecuarias en México. 138.
- 12.- Méndez, C. I.; (1991) Inoculación del virus del síndrome de ojo Azul del cerdo en embrión de pollo. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad de Guadalajara, Tesis de licenciatura. Guadalajara, Jalisco, México.
- 13.- Salazar, M. A.; (1992) Cambios Morfológicos en

fibroblastos de embrión de pollo infectados con un Paramyxovirus porcino. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad de Guadalajara. Tesis de licenciatura. Guadalajara, Jalisco, México.

14.- Galina, P.L.; Martínez, L.A.; Correa, G.P.; Colinas, T.A.; Anaya, E. A.H.; Ramírez, N.R.; (1989) Estudio Experimental en cerdos de diferentes edades instilados por vías naturales con el Paramyxovirus porcino de La Piedad Michoacán (PpLPM) Universidad Autónoma Metropolitana. VII AMVEC. 59-61.

15.- Campos, H. R.; Carbajal, S. M.; (1989) 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. 62-64.

16.- Martínez, L. A.; Correa, G. P.; Fajardo, M. R.; Garibay, S. M.; Moreno, L. J.; Ramos, R.I.; Rosales, F.; (1985) Un virus hemaglutinante similar a los Paramyxovirus que produce encefalitis y mortalidad en los cerdos. Reunión de Investigaciones Pecuarias en México. 81.

17.- Leeson, C. R.; Leeson, S. T.; (1977) Histología; Tercera Edición; Editorial Interamericana. 196-201.

18.- Langman, Jan.; (1976) Embriología Médica; Tercera Edición; Editorial Interamericana. 311-314.

19.- Noback, Ch. R.; Demarest, R. J.; (1987) "Sistema Nervioso Humano. Fundamentos de Neurobiología" McGraw Hill. 1a. Edición. 223-235.

- 20.- Leman, A. D.; Glock, R. D.; Mengeling, W. L.; Erwin, S.; Staw, B.; (1981) Diseases of swine . Fifth Edition. 1240-1253.
- 21.- Wilson, G. Pon.; Houpt, A. K.; (1980) Biología del cerdo, 1a. Edición. Editorial Acribia España. 12-16.
- 22.- Gillespie, J. H.; Timoney, F. J.; (1981) Hagan and Bruner infections diseases of domestic animals. Cornell University Press, 7th Edition. 1357-1402.
- 23.- Chairman, C. E. A.; Beard, C.; Cooper, R.; Hansen, P.R.; Pomery, S. B.; (1974) "Antigen titration" Hemoagglutination and Hemoagglutination-Inhibition test with Newcastle disease virus-microtiter technique. Committee on standart method for the hemoagglutination inhibition test for Newcastle disease. Reprints from 17 th Anual Proceedings American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians. 1-6.
- 24.- Mengeling, W. L.; (1964) Field evaluation of the fluorescent antibody tissue culture test for diagnosis of hog cholera. Proc. A. M. Vet. Med. Assoc. 1: 101-274.
- 25.- Feria-Velasco, A.; Karnovsky, M.; (1970) Preservación Optima del Sistema Nervioso Central por perfusión con glutaraldehido para estudio estructural. Arch. In. Med. (Méx.). 1: 201-220.
- 26.- Lee, G.; Luna, H. T.; (1968) Manual of Histologic staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology. Thrird Edition. 12-20.

27.- Estrada, F. E.; Peralta, Z. L.; Manzano, R. P.; (1982)  
Manual de técnicas Histológicas. Primera Edición. A.G.T.  
México Editor S.A. 75-77.

M. en C. Juan Luis Cifuentes Lemus.  
Director de la Facultad de Ciencias Biológicas  
de la Universidad de Guadalajara.

P R E S E N T E .

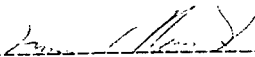
Estimado M. en C. Juan Luis Cifuentes Lemus:

Por medio de éste conducto, comunico a Ud. que la C. Beatriz Herrera Alvarado, pasante de la Licenciatura en Biología con el número de registro 34648159 ha concluido satisfactoriamente el trabajo de tesis titulado "ESTUDIO HISTOPATOLOGICO DEL CEREBELO DE CERDO INFECTADO CON EL VIRUS DEL SINDROME DE OJO AZUL". El cual se llevó a cabo en las instalaciones de la Facultad de Ciencias Biológicas a su digno cargo en el área de investigación.

Asimismo le informo que se ha revisado el manuscrito de la tesis y cumple con los requisitos establecidos por la H. Comisión de Tesis de ésta Facultad.


Sin más por el momento, aprovecho la ocasión para enviarle un afectuoso saludo.

A T E N T A M E N T E .  
Guadalajara, Jal. a 12 de Julio de 1993.  
Director de Tesis  
M.V.Z. Mario A. Ramírez Herrera.



---

Director de Tesis  
M.V.Z. María Luisa Mendoza Magaña.



---



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Expediente .....

Número .....

Sección ..... 221/93 .....

SRITA. BEATRIZ HERRERA ALVARADO  
P R E S E N T E . -

Manifestamos a usted, que con esta fecha ha sido aprobado el tema de Tesis "ESTUDIO HISTOPATOLOGICO DEL CEREBELO - DE CERDO INFECTADO CON EL VIRUS DEL SINDROME DE OJO AZUL" para obtener la Licenciatura en Biología.

Al mismo tiempo le informamos que ha sido aceptado como Director de dicha tesis el M.V.Z. Mario A. Ramírez Herrera.

A T E N T A M E N T E  
"PIENSA Y TRABAJA"  
Guadalajara, Jal., 12 de marzo de 1993

EL DIRECTOR



FACULTAD DE  
CIENCIAS BIOLÓGICAS

M. EN C. JUAN LUIS CIFUENTES LEMUS

EL SECRETARIO

BIOL. JESUS ALBERTO ESPINOSA ARIAS

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