

Informe final publicable de proyecto
CARACTERIZACIÓN DE LAS ALTERACIONES
NEUROFISIOLÓGICAS, HISTOPATOLÓGICAS E
INMUNOHISTOQUÍMICAS OCASIONADAS POR LA
INFECCIÓN NATURAL POR DISTEMPER EN CANINOS:
EVALUACIÓN DE DESMIELINIZACIÓN Y
NEURODEGENERACIÓN EN ASOCIACIÓN CON LOS
SIGNOS NEUROLÓGICOS

Código de proyecto ANII: FMV_1_2019_1_155934

28/12/2023

VERDES GARCÍA, José Manuel (Responsable Técnico - Científico)
DELUCCHI CASALONGUE, Luis (Co-Responsable Técnico-Científico)
IRIBARNEGARAY PERERA, María Victoria (Investigador)
LARRAÑAGA SPÓSITO, Camila (Investigador)
CALLIARI CUADRO, Aldo José (Investigador)
FEIJÓO CHÁCHARO, Gimena (Investigador)
PUENTES PALOMBO, Rodrigo (Investigador)
YAMASAKI, Kanji (Investigador)

Resumen del proyecto

El virus del Distemper canino (DC) causa una enfermedad de gran letalidad en cánidos, cursando con trastornos respiratorios, entéricos, dermatológicos y neurológicos. En el sistema nervioso (SN) provoca rigidez de nuca, déficits visuales, signos vestibulares, cerebelosos, paresia, paraplejia, convulsiones y mioclonias. Las encefalitis por DC se clasifican en: polioencefalitis y leucoencefalitis desmielinizante (más frecuente). Aunque la desmielinización no es la única responsable de los signos neurológicos, es característica del DC, presentándose 3 formas: aguda, subaguda y crónica. Estas lesiones empiezan a las 3 semanas post-infección, y pese a que inicialmente su estudio se centró en la alteración de los oligodendrocitos, hoy se sabe que son los astrocitos el "blanco" principal del virus, ocasionando la desmielinización central por la alteración celular del entorno cercano, y aunque se considera que puede deberse a un fenómeno de autoinmunidad, aún no se han dilucidado las causas.

Dada la complejidad de su patogenia, resulta crucial la identificación de marcadores biológicos que contribuyan a su diagnóstico, evolución clínica, al desarrollo de metodologías que mejoren su diagnóstico (electrofisiológico, molecular y anatomo-patológico).

En el presente proyecto se desarrollaron estudios clínicos, hematológicos, electrofisiológicos y moleculares en caninos domésticos infectados naturalmente con DC, recibidos en la Unidad de Neurología (FVET-Udelar). Estos estudios, en su conjunto, nos han permitido, además de la implementación de este proyecto, la consolidación de un equipo multidisciplinario para abordar integralmente esta enfermedad, ayudando a establecer diagnósticos certeros y ajustar los pronósticos de la discapacidad en los perros recuperados, mientras que en los casos de mal pronóstico, que mueran espontáneamente, o que se recomiende su eutanasia por motivos humanitarios, se estandarizaron técnicas de autopsia, toma de muestras, estudios histopatológicos, inmunohistoquímicos y moleculares, los que nos permitirán continuar profundizando en la etiopatogenia de esta enfermedad, usando las herramientas puestas a punto en la Unidad Patología de la FVET-Udelar.

Ciencias Agrícolas / Ciencias Veterinarias / No Corresponde / Patología Veterinaria

Palabras clave: virus del distemper canino / infección natural / neurodegeneración /

Introducción

El Distemper canino (DC) es una enfermedad infecciosa, multisistémica, causada por un virus ARN del género Morbillivirus. Este virus altamente infeccioso, se propaga por vía respiratoria causando una inmunosupresión perdurable en el tiempo (Beineke y col. 2009, de Vries y col. 2015, Lempp y col. 2014). Presenta distribución cosmopolita, afectando a cánidos domésticos y salvajes, causándoles gran mortalidad (Appel y Summers 1995). En los últimos años, han habido numerosos brotes en todo el mundo, incluso en animales vacunados (Feijóo y col. 2021, Feijóo 2020, Panzera y col. 2015). Feijóo y col. (2009) en un estudio de los pacientes neurológicos recibidos entre 1992 y 2005 por la FVET-Udelar, muestra una media de 5 casos mensuales de DC (12% del total de casos recibidos), teniendo en 2022, 52 casos registrados de DC. Asimismo se confirma que muchos de ellos enfermaron pese a estar vacunados, concordando con lo reportado por otros grupos (Feijóo y col. 2021, Feijóo 2020, Galán y col. 2014, Richards y col. 2011).

El DC cursa con trastornos respiratorios (Feijóo y col. 2019), entéricos, dermatológicos y neurológicos, con gran compromiso de los sistemas involucrados (Feijóo 2020). Se estima que entre un 25 y 75% de las infecciones son subclínicas (Sarute y col. 2011), causando también depleción linfocítica severa, favoreciendo así las infecciones secundarias (Beineke y col. 2009, de Vries y col. 2015, Lempp y col. 2014). Los daños del sistema nervioso pueden ser devastadores, ocasionando la muerte o dejando secuelas en los sobrevivientes (Headley y col. 2012, Koutinas y col. 2002). De acuerdo a la distribución lesional, así como a su patogénesis, la encefalitis por DC se clasifica como: polioencefalitis y leucoencefalitis. La leucoencefalomielitis desmielinizante es la forma más frecuente (Amude y Alfieri 2010), afectando cerebelo, región periventricular, tractos ópticos y médula espinal (Gutiérrez et al. 2023, Gutiérrez 2022, Feijóo y col. 2021, Ulrich y col. 2014). Estas lesiones aunque no son las únicas responsables de los signos neurológicos, son características de esta infección, presentándose en 3 formas: aguda, subaguda (Lempp y col. 2014) y crónica (Feijóo y col. 2021, Lempp y col. 2014, 39). Los estudios patogénicos del DC deberían considerar estos diferentes estadios de desmielinización. Las lesiones iniciales ocurren alrededor de las 3 semanas post-infección, y se desarrollan durante un período de inmunosupresión masiva, observándose pirexia y leucopenia por depleción de células linfocíticas (Carvalho y col. 2012, Vandeveldt y Zurbriggen 2005). Dependiendo del grado y la rapidez de la recuperación inmunitaria, los animales pueden morir (llegando al 50% de los

afectados), o pueden recuperarse después de desarrollar una enfermedad leve. Un grupo intermedio se recupera parcialmente, desarrollando la enfermedad crónica (Vandeveldde y Zurbriggen 2005).

Pese a que se ha intentado demostrar la alteración primaria de los oligodendrocitos como responsables de la desmielinización aguda, hasta ahora, solo se ha confirmado que los astrocitos, la microglia y en mucha menor medida los oligodendrocitos son las células gliales más afectadas (Vandeveldde y Zurbriggen 1995), e incluso se ha demostrado que la desmielinización precede a la desaparición de los oligodendrocitos, sin un efecto citolítico directo del virus del DC sobre estos (Schobesberger y col. 2002), sugiriéndose que la desmielinización central se daría más por interacción con otros tipos gliales o neuronales, resultando los oligodendrocitos finalmente afectados por su condición de “espectadores” del daño ocasionado sobre los astrocitos y la reacción de estos hacia el virus (Schobesberger y col. 2002, Vandeveldde y Zurbriggen 2005, Vandeveldde y Zurbriggen 1995). Estos son detalles de la patogenia de la enfermedad, que aún quedan por dilucidarse (Pratakpiriya y col. 2017, Schobesberger y col. 2002, Vandeveldde y Zurbriggen 2005, Vandeveldde y Zurbriggen 1995).

El DC ha sido propuesto como modelo de enfermedades desmielinizantes en el humano (Vandeveldde y Zurbriggen 2005). En particular, el DC comparte similitudes con la Esclerosis Múltiple (EM), habiendo sido descrita como la “esclerosis múltiple aguda de los caninos” (Verdes y col. 2023, Amude y Alfieri 2010, Ulrich y col. 2014). Ambas enfermedades presentan: neuritis óptica, alteraciones retinianas, paresias, plejias, incoordinación motora e inestabilidad en la marcha y movimientos anormales tales como mioclonias (Álvarez-Cermeño y col. 2007, Fernández y col. 2015, Fernández y Fernández 2003, Pueyo y col. 2010, Soderström 2001). En el DC así como en la EM, la identificación de marcadores biológicos que contribuyan al diagnóstico y seguimiento evolutivo es crucial, dada la complejidad de estas enfermedades y el escaso conocimiento de su fisiopatología (Álvarez-Cermeño y col. 2007, Barkhof 2002, Davis 2014, Fernández y col. 2013). Los estudios de potenciales evocados (PE) en el caso de la EM han constituido una herramienta valiosa, permitiendo hacer un seguimiento de la enfermedad y un pronóstico de daño (Ramanathan y col. 2013, Schlaeger y col. 2016). Dependiendo de las modalidades a estudiar, dichos estímulos pueden ser somato-sensitivos (PESS), visuales (PEV) o auditivos (PEA). Estos estudios permiten la detección precoz de alteraciones funcionales, con anterioridad a su manifestación clínica, e incluso en ausencia de síntomas (Cambron y col. 2012, Di Maggio y col. 2014, Kiiski y col. 2016, Kraft 2013, Ramanathan y col. 2013). A su vez, por estas técnicas pueden llegar a diferenciarse desmielinización y daño axonal (Klistorner y col. 2007, You y col. 2011). Hasta el momento, no existen reportes que describan cómo se afectan los PESS en los caninos con DC, siendo escasos los estudios de neuritis óptica asociada a DC que evalúen la vía visual por técnicas electrofisiológicas tales como los PEVs (Gutiérrez et al. 2023, Gutiérrez 2022). El seguimiento clínico que se realizará a cada paciente en la Unidad de Neurología del Hospital, al igual que las necropsias en los casos que mueren y son remitidos con la autorización de sus tenedores para su estudio post-mortem, han permitido estandarizar metodologías de trabajo y caracterizar el daño histopatológico de forma completa, sistemática y ordenada, para establecer asociaciones entre el grado y tipo de neurodegeneración y la carga viral en las regiones más afectadas en los animales con daños agudos, subagudos y crónicos (Verdes y col. 2023, Iribarnegaray 2023, Godiño y col. 2023), así como intentar correlacionarlo con las alteraciones de los registros electrofisiológicos (Gutiérrez et al. 2023, Gutiérrez 2022).

Por otro lado, y con respecto al daño axonal primario, algunos autores postulan que el mismo constituye una lesión inicial y progresiva, que incluso precede a la desmielinización (Lempp y col. 2014, Schobesberger y col. 2002, Vandeveldde y Zurbriggen 2005, Vandeveldde y Zurbriggen 1995). En estos casos, la axonopatía podría funcionar entonces, como un disparador para posteriores disturbios en la interacción axón–mielina–glia. Por lo tanto, la confirmación temprana del daño axonal, así como el estudio de los cambios desencadenantes del mismo, confrontaría la idea prevalente de una desmielinización primaria como única causa de la neurodegeneración por DC (Lempp col. 2014). Para estudiar este tipo de cambios, el diagnóstico histopatológico asociado a la inmunohistoquímica (IHQ) resultaron herramientas adecuadas (Feijóo y col. 2021), localizando y diferenciando los distintos grupos celulares, logrando así, caracterizar las lesiones neuroparenquimatosas existentes en el DC (Feijóo y col. 2021, Alldinger y col. 1993, Headley y col. 2009, Headley y col. 2001, Orsini y col. 2007). Complementando esta técnica, también se usó la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) precedida por retrotranscripción (RT) del ARN de la muestra, la que permitió diagnosticar ante- y post-mortem aquellos casos presuntivos de DC (Sarute y col. 2011, Frisk y col. 1999), secuenciando las cepas virales circulantes en los casos de Uruguay en animales vacunados y con infección con DC (Feijóo y col. 2021) y cuantificando la carga viral en las regiones con mayor daño mediante el uso de la digital droplet PCR –ddPCR– (Iribarnegaray 2023, Godiño y col. 2023).

En este proyecto se realizó un seguimiento clínico de los pacientes, registrando su evolución y los PEVs, para evaluar y caracterizar in vivo el tipo y grado de desmielinización existente, y correlacionarlo con la categorización de los signos clínicos. Además, en aquellos pacientes que murieron durante el seguimiento, se les realizó estudios anatómo-patológicos, inmunohistoquímicos y moleculares, para caracterizar las lesiones de diferentes tipos celulares, aportando conocimiento a la patogenia de la neurodegeneración temprana en simultáneo con la desmielinización característica del DC. Durante su

desarrollo se consolidó un grupo de estudio multidisciplinario de enfermedades neurodegenerativas en la FVET-Udelar, que seguirá trabajando de forma integral esta y otras enfermedades neurodegenerativas de los animales domésticos, como modelo animal para el estudio comparado de enfermedades neurodegenerativas, como la esclerosis múltiple del humano (Verdes y col. 2023).

Metodología/diseño del estudio

Población muestral: Los casos estudiados que se propusieron originalmente en el proyecto fueron caninos que concurrían a la consulta neurológica del Hospital Veterinario (FVET-Udelar), para establecer 3 grupos de estudio, de los cuales no se harían distinción entre sexo, raza, edad, ni estado vacunal.

- Grupo 1: Al menos 20 casos clínicos con signos clínicos compatibles con DC en curso, adquirido de forma natural. En este grupo terminamos estudiando más de 50 animales durante el proyecto y se continúan recibiendo para su estudio los casos recibidos en la Unidad Neurología del Hospital Veterinario (FVET-Udelar).
- Grupo 2: Al menos 10 perros sanos sin ningún signo de enfermedad general, que se utilizarán como controles para las pruebas neurofisiológicas. Se obtuvieron registros de más de 20 caninos sanos para estos estudios.
- Grupo 3: Al menos 5 caninos con vacuna vigente, que concurren a la consulta del Centro Hospital Veterinario (FVET-Udelar), y que se decida su eutanasia por causas no infecciosas y con ausencia de antecedentes de signos neurológicos de otro origen. Grupo Control para estudios post-mortem, histopatológicos e inmunohistoquímicos. En este caso, también se superó el número originalmente propuesto.

Además, se proponía obtener muestras de orina de los 15 animales controles, que integrarán los grupos 2 y 3, para confirmar la ausencia de reacción del genoma del virus del DC en estos animales mediante RT-PCR. Finalmente, se procesaron muestras de al menos 30 animales pertenecientes a estos grupos controles, incorporando como técnica más precisa para el diagnóstico molecular la digital droplet PCR (ddPCR).

Durante la consulta neurológica, también se utilizó un test rápido inmunocromatográfico para la detección cualitativa de antígenos del virus del moquillo canino (VDC), que permite detectar antígenos virales en secreciones nasales u oculares, orina o líquido cefalorraquídeo (LCR) en los perros infectados en 5 minutos (Fast test® Distemper, Megacor, Austria).

Los criterios de inclusión al Grupo 1, fueron la presencia de signos clínicos característicos de la enfermedad y la detección de la presencia de genoma viral mediante las técnicas de inmunocromatografía y de PCR mencionadas anteriormente.

A cada animal se le realizó un examen físico general y un examen neurológico, así como se midieron diferentes parámetros hematológicos (hemograma completo).

Diseño de la Investigación: La metodología utilizada para cumplir el objetivo específico 1 (Determinar si existen alteraciones en los Potenciales Evocados Visuales (PEV), Somatosensitivos (PESS) y Electrorretinograma (ERG) en caninos infectados con el VDC, fue la siguiente (Gutiérrez 2022). Brevemente, se estudiaron por pruebas de PEV, ERG y PESS, todos los animales pertenecientes a los Grupos 1 y 2. El registro electrofisiológico se realizó con el Sistema Bio-PC Potenciales Evocados V.9 (Akonic S.A. Argentina), usando electrodos de aguja, de colocación subdérmica; uno activo o de registro (+) próximo al área generadora de las respuestas eléctricas, otro de referencia (-) alejado del anterior, y un tercer electrodo de tierra (G). Como estímulos luminosos para el registro de los PEV y ERG, se emplearon flashes de luz blanca generados por un estroboscopio a 1 Hz de frecuencia, colocados próximos al ojo a estimular, sin tocar los párpados. Se realizaron estimulaciones monoculares, tapando el ojo contralateral al estímulo con un parche opaco para aislar las respuestas de cada ojo y así detectar asimetrías funcionales entre ambos. De las muestras obtenidas, se cuantificaron la latencia (milisegundos que demora en aparecer la onda) y amplitud de la misma (valor máximo tanto negativo como positivo que puede adquirir la onda). En el caso de los PESS se calculó la Velocidad de Conducción por lo cual fue necesario medir la longitud del miembro posterior, así como el Tiempo de Conducción Central.

Para el seguimiento clínico y los estudios hematológicos de cada animal, se realizó un registro clínico en planilla individual a lo largo de la enfermedad. Cada uno de estos signos clínicos se calificó como ausente, leve, moderado o severo. Dicha planilla sirvió para controlar la evolución del caso y lograr posteriormente asociarlos a los hallazgos anatómopatológicos en el cerebro. A su vez, se tomaron muestras de sangre en tubo con EDTA y de orina en frascos estériles. Se procesaron en el Laboratorio de Análisis Clínicos de la FVET-Udelar (hemograma completo y análisis de orina). Parte de las mismas se usaron para desarrollar el test rápido de inmunocromatografía y las PCR para identificar la presencia de VDC. De acuerdo a la sobrevida de los individuos, se evaluó lo ocurrido con los PEs, asociándolos con el grado de alteración y recuperación. El criterio de finalización de dicho registro clínico, se hizo considerando como límite de tiempo 3 meses posteriores al inicio del seguimiento. Considerando este tiempo suficiente para que el paciente se hubiese recuperado clínicamente, pudiendo continuar con mioclonias.

En aquellos casos de muerte natural o eutanasia de los pacientes que no se recuperaron, se procedió antes de las 24 horas

de muerte, a la autopsia completa y toma de muestras (líquido cefalorraquídeo, orina, hemisferios cerebrales, cerebelo, bulbo raquídeo, tracto óptico, región cervical de médula espinal, pulmón, hígado, bazo, riñón, linfonodos, intestino delgado y grueso). Las muestras de SNC fueron hemiseccionadas, quedando la hemisección derecha (incluyendo: hemisferio cerebral cerebelo, bulbo raquídeo, tracto óptico, región cervical de médula espinal, pulmón, hígado, bazo, riñón, linfonodos, intestino delgado y grueso), para procesamiento histológico, fijándolas en formol tamponado al 10%. La hemisección izquierda del Sistema Nervioso Central se conservó a -80°C para identificación y cuantificación del virus por las técnicas de PCR mencionadas (RT-PCR y ddPCR).

Las muestras fijadas en formol tamponado al 10%, luego de 5 días en fijador, fueron procesadas de acuerdo a Verdes et al. (2023), incluidas en parafina y cortadas a 4 μm de espesor, teñidas con Hematoxilina-Eosina y con Luxol Fast Blue-Cresil Violet, para describir lesiones de poliencefalitis en áreas corticales y núcleos del tronco encefálico y/o de leucoencefalitis desmielinizante de cerebelo, región periventricular, tractos ópticos y medula espinal (Vandeveldt y Zurbriggen 1995, 2005). Con el fin de detectar antígenos celulares y virales, se utilizó la inmunohistoquímica basada en el método ABC asociado a DAB. El grado de inmunoreactividad se puntuó semi-cuantitativamente como: (+), células positivas individuales; +, foco individual de células inmunopositivas; ++, número moderado de células inmunopositivas; y +++, numerosas células inmunopositivas (Gimeno y col. 2000). Por detalles de los anticuerpos a utilizar para la técnica de Inmunohistoquímica (Verdes y col. 2023, Feijóo y col. 2021, Feijóo 2020).

Para la ddPCR, sobre la base de los hallazgos histopatológico e inmunohistoquímicos, se estableció la clasificación por curso: agudo, subagudo y crónico. En los mismos casos en los que se realizó el estudio histopatológico, se tomaron muestras del parénquima cerebeloso contralateral (50 mg) y se realizó la extracción de ARN mediante TRIZOL™ (Invitrogen), siguiendo el protocolo del fabricante. Posteriormente, se realizó la detección de ARN del VDC mediante RT-PCR convencional. Luego se cuantificó la carga viral mediante la ddPCR (Godiño y col. 2023, Iribarnegaray 2023)

Para las RT-PCR, se utilizó la metodología descrita previamente (Sarute y col. 2011, Frisk y col. 1999). Los productos del PCR fueron visualizados mediante electroforesis en gel de poliacrilamida al 6 % y revelados por tinción de nitrato de plata (Sarute y col. 2011, Frisk y col. 1999). Finalmente, los productos de la PCR se secuenciaron en Macrogen (Corea) para identificar las variantes de VDC circulantes en los casos de caninos con infección natural (Feijóo et al. 2021).

Análisis Estadístico

Este estudio se centró en el estudio de un número acotado de casos naturales de DC, por lo que buena parte de los resultados generales se presentaron de forma descriptiva (Feijóo 2020).

A partir de los datos previamente descritos, fueron utilizados estadísticos de frecuencias para las variables categóricas (sexo, raza, plan de vacunación, inicio de signos clínicos, sobrevida). Para verificar si existía asociación entre las variables categóricas se utilizó la prueba de Chi cuadrado (χ^2) y el Test exacto de Fisher. Para ello se usó el software estadístico computacional R Core Team 2020 (A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>). Se utilizó un intervalo de confianza de 95% y el nivel de significancia fue de $p < 0.05$. Posteriormente se estudió la asociación estadística entre las variables analizadas, usando regresión logística (Feijóo 2020).

Resultados, análisis y discusión

El distemper canino es una infección multisistémica, letal; provocada por un Morbillivirus. Frecuentemente afecta al sistema nervioso. La leucoencefalitis desmielinizante es la forma más frecuente de Distemper neurológico. Ha sido vinculado con la esclerosis múltiple (EM) por sus mecanismos de injuria similares. Se ha determinado en EM que los potenciales evocados visuales (PEV) y somatosensitivos (PESS) son muy buenos marcadores del curso de la enfermedad y permiten detectar precozmente lesiones que se sospechan a nivel clínico (Gutiérrez 2022).

Durante la consulta clínica de los caninos infectados por el VDC, los signos neurológicos observados con mayor frecuencia fueron: mioclonias, signos medulares, encefalitis y convulsiones. El 95% de los animales no vacunados presentaron mioclonias. Además, todos tuvieron algún signo sistémico de la infección, en forma simultánea o previamente a la aparición de los signos neurológicos (Feijóo y col. 2021, Feijóo 2020).

Durante la primera consulta neurológica y posteriormente durante todo el tiempo de evolución de los pacientes, se registraron los PEV, ERG (electrorretinograma) y PESS de miembros posteriores a nivel craneal y espinal tanto en caninos infectados naturalmente con Distemper y en caninos sanos. Se demostró un aumento de la latencia de las ondas N1, P1, N2, P2 y N3 del PEV bilateralmente, sin alteraciones en las amplitudes de las mismas. Para el ERG no se encontró diferencias entre ambos grupos. En cuanto a los PESS se encontró un aumento de la latencia de las ondas P1 y N1 en el registro craneal, sin alteraciones de la amplitud. No se hallaron alteraciones en las latencias a nivel espinal; asimismo, existió un aumento en la amplitud N1-P1; P1-N2 y N2-P2 en los registros espinales (Gutiérrez y col. 2023 —en revisión—, Gutiérrez 2022)

Los animales infectados sobrevivientes fueron el 51%, con un mayor tiempo de sobrevivencia en los vacunados y los mayores de 6 meses (Feijóo 2020).

Con respecto a las lesiones anatomopatológicas e histopatológicas, el hallazgo constante fue la desmielinización. Además, se observó gliosis, leptomeningitis, manguitos perivasculares, necrosis y cuerpos de inclusión, siendo estos hallazgos más severos en el cerebelo. Además, usando la inmunohistoquímica contra el virus de Distemper canino, se co-localizó la presencia del virus en aquellas regiones con los mencionados daños histopatológicos, principalmente en astrocitos. La única diferencia histopatológica entre vacunados y no vacunados, fue la presencia de zonas de hemorragia perivascular en los no vacunados (Feijóo 2020).

El estudio estadístico no encontró asociaciones entre signos neurológicos y los hallazgos histopatológicos. Aunque se pudieron identificar dos de las rutas de ingreso del virus al sistema nervioso, a través de la diseminación hematogena directa, así como a través del fluido cerebroespinal (Feijóo 2020).

En las muestras provenientes de la hemisección derecha de los cerebelos de caninos infectados con VDC, sobre la base de las lesiones y de la cantidad de células inmunomarcadas, se estableció la clasificación por curso: agudo, subagudo y crónico. En la misma región de cerebelo de la hemisección izquierda (conservada a -80°C para estudios moleculares), se tomaron muestras del parénquima cerebeloso contralateral (50 mg) y se realizó la extracción de ARN mediante TRIZOL™ (Invitrogen), siguiendo el protocolo del fabricante. Posteriormente, se realizó la detección de ARN del VDC mediante RT-PCR convencional. Luego se cuantificó la carga viral mediante la ddPCR (Godiño y col. 2023, Iribarnegaray 2023).

Las lesiones subagudas incluyeron desmielinización focalmente extensa, extensa gliosis, necrosis neuronal, manguitos perivasculares prominentes (2 a 3 capas de células inflamatorias mononucleares), cuerpos de inclusión de CDV evidentes y numerosas células CDV-positivas. Las lesiones crónicas fueron similares a las de la etapa subaguda, pero con mayor número de neuronas en degeneración y necrosis, con manguitos perivasculares de al menos 3 capas. Se observó que un 65 % de las muestras analizadas correspondieron a lesiones agudas, el 10% a lesiones subagudas y el 25% lesiones crónicas. Mediante la ddPCR se observó una tendencia a presentar mayor carga viral en los casos con lesiones agudas y crónicas que en aquellas con lesiones subagudas (Godiño y col. 2023).

Paralelamente, y a partir de los estudios moleculares (RT-PCR y ddPCR) se realizó la secuenciación genética de las cepas virales del moquillo canino en animales vacunados, se confirmaron dos cepas de campo sudamericanas (Kiki y Uy251), ambas del linaje Europa-1 / Sudamérica-1, que no están incluidas en las vacunas comerciales disponibles en Uruguay (Feijóo y col. 2021).

Conclusiones y recomendaciones

En base a nuestros resultados clínicos y anatomo-patológicos y dada la alta tasa de prevalencia de animales con Distemper canino en el país, la enfermedad siempre debería incluirse dentro del diagnóstico diferencial en perros con enfermedad neurológica, incluso en aquellos animales vacunados, ya que, en este proyecto, se identificaron un porcentaje de caninos vacunados en los que se desarrolló la enfermedad neurológica de VDC, que incluso llevaron a su muerte.

En los casos vacunados y que desarrollaron Distemper neurológico que llevó a su muerte, se identificaron cepas de campo sudamericanas (Kiki y Uy251), ambas del linaje Europa-1 / Sudamérica-1, que no están incluidas en las vacunas comerciales disponibles en Uruguay, por lo que podrían ser un futuro aporte de este proyecto, contribuir al desarrollo de vacunas nacionales contra el VDC que incluyan las cepas circulantes en el país.

Los resultados electrofisiológicos pueden ayudar a establecer un diagnóstico precoz de daño neurológico vinculado a Distemper, dado que muchas veces, los signos neurológicos de los pacientes con Distemper, aparecen más tardíamente que los signos digestivos o respiratorios. Por lo tanto, la realización de estos estudios de forma rutinaria y protocolizada, podría ser una herramienta valiosa en la clínica neurológica, para detectar trastornos en la conducción nerviosa central, aún en fases subclínicas de la enfermedad.

De acuerdo a los resultados obtenidos con la ddPCR, podemos afirmar que resultó una técnica sensible y precisa para la determinación de carga viral en aquellos casos diagnosticados clínicamente como distemper neurológico y clasificados como agudos y crónicos, siendo estos el 75% de los casos estudiados. Con respecto a los casos clasificados histológicamente como subagudos, se requiere un mayor estudio de su patogenia para entender las causas de la menor carga viral en muestras de cerebelo.

Referencias bibliográficas

- Alldinger, S.; Baumgärtner, W.; Örvell, C. (1993). Restricted expression of viral surface proteins in Canine Distemper encephalitis. *Acta Neuropathologica* 85:635-645.
- Álvarez-Cermeño y col. (2007). Guía Para Diagnóstico y Tratamiento de Esclerosis Múltiple. 103p.
- Amude, A. y Alfieri, A. (2010). Canine distemper virus and multiple sclerosis: A real or an anecdotal association?. In: Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology. A. Méndez-Vilas (Ed.) Applied Microbiology, World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd. Singapore. p.737-745.
- Appel, M. y Summers, B. (1995). Pathogenicity of morbilliviruses for terrestrial carnivores. *Veterinary Microbiology* 44:187-191.
- Barkhof, F. (2002). The clinico-radiological paradox in multiple sclerosis revisited. *Current Opinion in Neurology* 15:239-245.
- Beineke, A. y col. (2009). Pathogenesis and immunopathology of systemic and nervous canine distemper. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 127:1-18.
- Cambron, M. y col. (2012). White-matter astrocytes, axonal energy metabolism, and axonal degeneration in multiple sclerosis. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 32:413-424.
- Carvalho, O.V. y col. (2012). Immunopathogenic and neurological mechanisms of Canine Distemper Virus. *Advances in Virology Article ID 163860*, p. 1-10.
- Davis, F. (2014). The clinico-radiological paradox in multiple sclerosis: novel implications of lesion size. *Multiple Sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)* 20:515-516.
- de Vries, R.; Duprex, W.; de Swart, R. (2015). Morbillivirus Infections: An Introduction. *Viruses [Internet]* 7:699-706.
- di Maggio, G. y col. (2014). Optical coherence tomography and visual evoked potentials: which is more sensitive in multiple sclerosis?. *Multiple sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)* 20:1342-1347.
- Feijóo, G., Yamasaki, K., Delucchi, L., Verdes, J.M. (2021). Central nervous system lesions caused by canine distemper virus in 4 vaccinated dogs. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 33: 640–647.
- Feijóo, G. (2020). Distemper canino: Seguimiento desde la presentación clínica hasta sus hallazgos histopatológicos e inmunohistoquímicos. Tesis de Maestría en Salud Animal. Programa de Posgrados de la Facultad de Veterinaria, Udelar. Montevideo, Uruguay. 114pp.
- Feijóo, G., Yamasaki, K., Verdes, J.M. (2019). Lung lesions of non-vaccinated puppies affected by canine distemper virus. *Braz J Vet Pathol* 12:83-87.
- Feijóo, G. y col. (2009). Distemper canino: estudio epidemiológico retrospectivo en el Hospital de la Facultad de Veterinaria: 1992 – 2005. 7° Congreso Nacional AUVE – SUVEPA. Hipódromo Nacional de Maroñas. 4 y 5 de noviembre de 2009. Montevideo. Uruguay.
- Fernández, O.; Fernández, V.; Guerrero, V. (2015). Enfermedades desmielinizantes del sistema nervioso central. *Revista de la Educación Superior [Internet]* 11:4601-4609.
- Fernández, O. y col. (2013). Biomarcadores en esclerosis múltiple. *Revista de Neurología* 56:375-390.
- Fernández, O. y Fernández, V. (2003). Esclerosis múltiple. *Revista de la Educación Superior* 11:4610-4621.
- Frisk, A. L. y col. (1999). Detection of Canine Distemper Virus Nucleoprotein RNA by Reverse Transcription – PCR Using Serum, Whole Blood, and Cerebrospinal Fluid from dogs with Distemper. *Journal of Clinical Microbiology* 37:3634-3643.
- Galán, A. y col. (2014). Uncommon acute neurologic presentation of canine Distemper in 4 adult dogs. *Canadian Veterinary Journal* 55:373-378.
- Gimeno, E.; Massone, A.; Portiansky, E. (2000). Introducción a las Técnicas de Inmunohistoquímica y aplicaciones en Patología Veterinaria. Duodécimo Curso Internacional de Posgrado en Técnicas de Inmunohistoquímica, Lectinohistoquímica y Microscopía Electrónica. Universidad Nacional de la Plata. Argentina.
- Godiño, G., Iribarnegaray, V., Larrañaga, C., Puentes, R., Verdes, J.M. (2023). Puesta a punto de una PCR DIGITAL (DROPLET DIGITAL PCR) para cuantificar y comparar los cambios histopatológicos generados por el virus del Distemper canino en muestras de cerebros. Libro de resúmenes de la XIII Reunión Argentina de Patología Veterinaria. Salta, (caso 71).
- Gutiérrez, M., Mondino, A., Delucchi, L., Bielli, A., Verdes, J.M. (2023). Prolonged visual evoked potential latencies in dogs naturally infected with canine Distemper virus. 35 cases. *Journal of Small Animal Practice - Manuscript JSAP-2023-0209* (en revisión).
- Gutiérrez, M. (2022). Evaluación de la neurodegeneración ocasionada por la infección natural con el virus del Distemper canino mediante potenciales evocados visuales y somatosensitivos del miembro posterior. Tesis de Maestría en Salud Animal. Programa de Posgrados de la Facultad de Veterinaria, Udelar. Montevideo, Uruguay. 45pp.

Headley, S. y col. (2012). Epidemiological features and the neuropathological manifestations of canine distemper virus-induced infections in Brazil: A review: *Ciencias Agrarias* 33:1945-1978.

Headley, S. y col. (2009). Molecular detection of Canine Distemper Virus and the Immunohistochemical characterization of the neurologic lesions in naturally occurring old dog encephalitis. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 21:588-597.

Headley, S.; Soares, I.; Graça, D. (2001). Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP) immunoreactive Astrocytes in dogs infected with Canine Distemper Virus. *Journal of Comparative Pathology* 125:90-97.

Iribarnegaray, V. (2023). Virus del Distemper Canino: caracterización de la infección viral y mejora del diagnóstico a partir de herramientas de última generación. XIX Jornadas de la Sociedad de Neurociencias del Uruguay (SNU) Facultad de Ciencias, Udelar. Montevideo, 27 y 28 de septiembre 2023 (presentación oral).

Kiiski, H. y col. (2016). Delayed P100-Like Latencies in Multiple Sclerosis: A Preliminary Investigation Using Visual Evoked Spread Spectrum Analysis. *PLoS ONE* 11:1.

Klistorner, A. y col. (2007). Electrophysiological evidence for heterogeneity of lesions in optic neuritis. *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 48:4549-4556.

Koutinas, A. y col. (2002). Relation of clinical signs to pathological changes in 19 cases of canine distemper encephalomyelitis. *Journal of Comparative Pathology* 126:47-56.

Kraft, GH. (2013). Evoked Potentials in Multiple sclerosis. *Physical Medicine and Rehabilitation Clinics of North America*, 24:717-720.

Lempp, C. y col. (2014). New aspects of the pathogenesis of canine distemper leukoencephalitis. *Viruses* 6:2571-2601.

Orsini, H. y col. (2007). Marcação Imunoistoquímica da expressão astrocitária de Proteína Glial Fibrilar Ácida e de Vimentina no Sistema Nervoso Central de cães com Cinomose. *Arquivos de Neuropsiquiatria* 65:1070-1077.

Panzer, Y. y col. (2015). Molecular phylogeography of canine distemper virus: Geographic origin and global spreading. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 92:147-154.

Pratakipiriya, W y col. (2017). Expression of canine distemper virus receptor nectin-4 in the central nervous system of dogs. *Scientific Reports*: 7:349.

Pueyo, V.; Ara, J.; Martin, J. (2010). La retina como marcador biológico de daño neuronal. *Archivo de la Sociedad Española de Oftalmología* 85:163-164.

Ramanathan, S. y col. (2013). The utility of multimodal evoked potentials in multiple sclerosis prognostication. *Journal of Clinical Neuroscience* 20:1576-1581.

Richards, T. y col. (2011). Optic neuritis caused by canine distemper virus in a Jack Russell terrier. *Canadian Veterinary Journal* 52:398-402.

Sarute, N. y col. (2011). Primer diagnóstico molecular y caracterización parcial del gen de la nucleoproteína del Virus Distemper Canino en Uruguay. *Veterinaria (Montevideo)*, 47:7-13.

Schlaeger, R. y col. (2016). Clinical Neurophysiology Monitoring multiple sclerosis by multimodal evoked potentials: Numerically versus ordinally scaled scoring systems. *Clinical Neurophysiology* 127:1864-1871.

Schobesberger, M. y col. (2002). Demyelination precedes oligodendrocyte loss in canine distemper virus-induced encephalitis. *Acta Neuropathologica* 103:11-19.

Söderström, M. (2001). Optic neuritis and multiple sclerosis. *Acta Ophthalmologica Scandinavica* 79:223-227.

Ulrich, R. y col. (2014). Transcriptional changes in canine distemper virus-induced demyelinating leukoencephalitis favor a biphasic mode of demyelination. *PLoS One* 9: 4.

Vandeveld, M. y Zurbriggen, A. (1995). The neurobiology of canine distemper virus infection. *Veterinary Microbiology* 44:271-280.

Vandeveld, M. y Zurbriggen, A. (2005). Demyelination in canine Distemper virus infection: a review. *Acta Neuropathologica* 109:56-68.

Verdes, J.M., Larrañaga, C., Varela, B., Iribarnegaray, V., Yozzi, V., Feijóo, G., Yamasaki, K. (2023). Histopathological analysis of brains from dogs infected with canine distemper virus. *Methods in Molecular Biology* (en prensa).

You, Y. y col. (2011). Latency Delay of Visual Evoked Potential Is a Real Measurement of Demyelination in a Rat Model of Optic Neuritis. *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 52:6911-6918.

Licenciamiento

Reconocimiento 4.0 Internacional. (CC BY)