



## UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

## FACULTAD DE VETERINARIA

Programa de posgrados

# CARACTERIZACIÓN HISTOPATOLÓGICA E INMUNOHISTOQUÍMICA DE LESIONES EN SISTEMA NERVIOSO OCASIONADAS POR LA INFECCIÓN NATURAL POR EL VIRUS DEL DISTEMPER EN CANINOS

# DCV Camila LARRAÑAGA SPOSITO

TESIS DE MAESTRÍA EN SALUD ANIMAL

URUGUAY 2024





## UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

## FACULTAD DE VETERINARIA

Programa de posgrados

# CARACTERIZACIÓN HISTOPATOLÓGICA E INMUNOHISTOQUÍMICA DE LESIONES EN SISTEMA NERVIOSO OCASIONADAS POR LA INFECCIÓN NATURAL POR EL VIRUS DEL DISTEMPER EN CANINOS

DCV Camila LARRAÑAGA SPOSITO

José Manuel Verdes Director de Tesis

山崎貧俗

Kanji Yamasaki Co-director

#### INTEGRACIÓN DEL TRIBUNAL DE DEFENSA DE TESIS

Ex - Prof. Agr., M. Sc., Dr. Luis Delucchi.

Ex – Responsable de la Unidad de Neurología del Departamento de Clínica y Hospital Veterinario. Facultad de Veterinaria,

Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.

Prof. Dr. Claudio Barbeito. Instituto de Patología General. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata (UNLP), Argentina.

> Prof. Dr. Fabiano Sant'Ana. Laboratorio de Patología Veterinaria. Universidade de Brasília, Brasília DF, Brasil.



Centro de Posgrados y Educación Permanente Facultad de Veterinaria Universidad de la República

## ACTA DEFENSA DE TESIS DE MAESTRIA

#### ORIENTACIÓN: Maestría en Salud Animal

LUGAR Y FECHA DE LA DEFENSA: 25/07/2024

TRIBUNAL: Dr. Luis Delucchi (presidente), Dr. Claudio Barbeito, Dr. Fabiano Sant'Ana.

CI	NOMBRE	CALIFICACIÓN	NOTA
4792421 - 9	Camila,Larrañaga Sposito	lZ	5.5.5.
NOTA: La cali	ficación mínima para aprobar la defensa es B.B.B (6	)	

CLAUDIO BARBE 170

NO SANT'ANA

TRIBUNAL

FIRMA

re le co de Indat e the das and ma List 10

Send in beto Sobreselilit 2 FABIANO CLAUDIO BARBEITA RELIENTH

ORIENTACION: Maestria en Salud Animal

LUGAR V FECHA DE LA DEFENSA: 25/07/2024

TRIBUMAL: Gr. Luis Delucchi (presidente), Or. Claudio Barbeito, Dr. Fabiano Sant'Ano.

		差对 自然的特征		
			ana poloso HID	

FIRMA

#### AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mi director, José Manuel Verdes, por brindarme la oportunidad de integrarme a su equipo de investigación y poder llevar a cabo este trabajo, a mi co-director y amigo, Kanji Yamasaki por sus valiosas enseñanzas tanto académicas como personales y su ánimo constante.

A la Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII) por el apoyo económico otorgado través de una beca de maestría, bajo el código POS\_FMV\_2020\_1\_1010108.

A todos mis compañeros de trabajo de la Unidad Académica de Patología, especialmente a aquellos que se convirtieron en grandes amigos: Belén Varela, Victoria Yozzi, Victoria Machín, Guillermo Godiño y Cecilia Abreu. Gracias por su presencia durante todo el proyecto, brindándome apoyo técnico y personal.

A mis padres, Alba y Milton por haberme enseñado el valor del esfuerzo y la superación.

A Federico, mi compañero de vida, por su apoyo y aliento constantes. Y, por último y más importante a mis hijos, Felipe y Nahuel, quienes son mi mayor motivación para seguir adelante.

# ÍNDICE DE CONTENIDOS

RE	ESUMEN	1
SL	JMMARY	2
1.	FUNDAMENTO TEÓRICO	3
	1.1. Introducción general	3
	1.2. Patogenia de la invasión viral	4
	1.3. Mecanismos propuestos de desmielinización en la leucoencefalomielitis	5
	1.4. Patogenia de la reacción glial frente a la neuroinvasión del VDC	6
	1.4.1. Reacción astrocitaria	6
	1.4.2. Reacción microglial	7
	1.5. Modulación intracelular del calcio en neuronas y su alteración en la patogenia de la nuerodegeneración	8
	1.6. Estadificación de los hallazgos en el SNC de caninos infectados por el VDC	9
2.	HIPÓTESIS	10
3.	OBJETIVOS	10
	3.1. Objetivo general	10
	3.2. Objetivos específicos	10
4.	MATERIALES Y MÉTODOS	11
	4.1. Población animal	11
	4.2. Procesamiento de material	11

	4.3. Análisis histopatológico e inmunohistoquímico	12
	4.4. Captura y análisis de imágenes	13
	4.5. Análisis estadístico	14
5.	. RESULTADOS	15
	5.1.Estadificación de la enfermedad	15
	5.2. Grado de desmielinización	15
	5.3. Relación entre cada etapa de la enfermedad, edad y sexo	19
	5.4 Hallazgos histopatológicos e inmunohistoquímicos	19
6.	DISCUSIÓN	35
7.	CONCLUSIONES	38
8	B. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39
9.	ANEXOS	44
	I. Hematoxilina-Eosina	44
	II. Luxol Fast Blue	45
	III. Inmunohistoquímica	46
	IV. Publicaciones	49

#### RESUMEN

El propósito de este estudio fue examinar la relación entre la desmielinización y las respuestas de las células gliales en el cerebelo de perros infectados naturalmente con el Virus del Distemper Canino (VDC). Partiendo de la estadificación de la enfermedad previamente informada desde la etapa aguda a la etapa crónica, la subdividimos agregando el grado de desmielinización determinado por la tinción con Luxol Fast Blue, e investigamos la relación entre la desmielinización y las diferentes células gliales de cada etapa. Se observaron reacciones de astrocitos y microglia en una etapa temprana, cuando la desmielinización aún no era evidente. Los cambios progresaron con la desmielinización. Dicha desmielinización comenzó en la sustancia blanca del tronco encefálico contiguo al cuarto ventrículo y gradualmente se extendió a todo el cerebelo, incluida la corteza cerebelosa. Desde la etapa inicial, se observaron acúmulos de inmunomarcación de VDC junto con la aparición simultánea de cuerpos de inclusión. Se visualizó inmunomarcación contra ribonucleoproteínas de VDC y cuerpos de inclusión en astrocitos, microglía, neuronas, células ependimarias, e incluso células mononucleares leptomeníngeas. Por otro lado, desde una etapa temprana se observó la inmunomarcación contra VDC desde la piamadre hasta la sustancia gris y más adelante en la sustancia blanca a través de la capa granular. Las células de Purkinje disminuyeron progresivamente desde la etapa intermedia y se observó también un descenso de las neuronas en la capa granular. No hubo una asociación clara entre la edad de los animales y cada etapa de la enfermedad, y las etapas no progresaron con la edad.

#### SUMMARY

The purpose of this study was to examine the relationship between demyelination and glial cell responses in the cerebellum of Canine Distemper Virus (CDV) infected dogs. We subdivided the disease staging by adding the degree of demyelination determined by Luxol Fast Blue staining to the previously reported disease staging from the acute stage to the chronic stage, and investigated the relationship between demyelination and each glial cell in each stage. Reactions of astrocytes and microglia were observed at an early stage when demyelination was not evident. Changes progressed with demyelination. Initially, demyelination began in the medulla adjoining the fourth ventricle, and gradually spread to the entire cerebellum, including lobes. Immunostaining against CDV was visualized from the early stage, and inclusion bodies, also appeared simultaneously. Immunostaining against CDV ribonucleoproteins and inclusion bodies were observed in astrocytes, microglia, neurons, ependymal cells, and even leptomeningeal mononuclear cells. On the other hand, immunostaining against CDV from the pia mater to the gray matter and further into the white matter through the granular layer was observed from an early stage. Purkinje cells diminish from the intermediate stage, and a decrease in neurons in the granular layer was also observed. There was no clear association between age and each stage, and the stages did not progress with age.

## 1. FUNDAMENTO TEÓRICO

#### 1.1 Introducción general

El virus del Distemper Canino (VDC) fue aislado por primera vez en 1905 por Carré (Appel 1995). Se ha descrito que diferentes mamíferos del orden carnívora, como los de las familias Ailuridae, Canidae, Hyaenidae, Mustelidae, Procyonidae, Ursidae, Viverridae y Felidae son susceptibles a la infección por VDC (Appel y Summers 1995). En 1988 se confirma la presencia del virus perteneciente al género morbillivirus en diferentes mamíferos marinos como los pinnípedos y cetáceos, siendo responsable de importantes epizootias (Guardo et al. 2005).

Se trata de un virus de ARN negativo, monocatenario, no segmentado y envuelto, que codifica seis proteínas estructurales y dos no estructurales (Noyce et al. 2013). Pertenece al género *Morbilivirus,* familia *Paramyxoviridae* y posee distribución mundial. La envoltura viral hace que el virus sea lábil y se inactive fácilmente con detergente. Sobrevive pocas horas a temperatura ambiente, pudiendo sobrevivir más durante los meses de invierno (Wilkes 2022). Al tratarse de una enfermedad de distribución mundial y potencialmente mortal la vacunación en caninos es esencial (Franco y Puentes 2020, Day et al. 2016).

Las cepas virales se clasifican dentro de linajes geográficos basadas en la variabilidad de la hemaglutinina (H) y el péptido señal de las proteínas de fusión (Fsp). El primer reporte de la cepa Uy251/2012 de Sur América se realizó en Uruguay, donde se amplificó la codificación completa y la región inter-genérica, observando que el código genómico contiene 15,447 pb, abarcando 6 genes (3' N– P-M-F–H-L 5') (Sarute et al. 2014).

Es altamente contagioso, se transmite a través de partículas virales en el aire, por gotas de aerosol, contacto directo con fluidos corporales o a través de fómites (Rendon-Marin et al. 2019). Entra al hospedador por vía nasal u oral e inicia su replicación, utilizando la señal molecular linfocitaria de activación, dichos receptores se encuentran en macrófagos alveolares y/o células dendríticas del tracto respiratorio. Las células infectadas diseminan el virus a través del sistema linfático entre 3 a 6 días, siguiendo por el tejido epitelial aproximadamente a los 10 días post-infección. El virus es amplificado y secretado por las células epiteliales de los sistemas respiratorio, gastrointestinal y urinario (Zhao et al. 2015).

El VDC tiene la capacidad de infectar tres tipos diferentes de células, es decir tiene tropismo linfático, neurológico y epitelial, resultando en una infección sistémica, incluyendo los sistemas respiratorio, digestivo, urinario, linfático, endocrino, cutáneo, esquelético y sistema nervioso central. La infección ocasiona: fiebre, erupción cutánea, signos respiratorios, linfopenia, profunda inmunosupresión y una alta incidencia de alteraciones neurológicas (Beineke et al. 2015). El primer modo de infección es por vía inhalatoria, el virus se replica en el tejido linfoide del tracto

respiratorio alto, donde luego se propaga principalmente por medio de los monocitos y macrófagos. Luego de un período variable de incubación (1-4 semanas) los animales desarrollan una fiebre bifásica característica (Beineke et al. 2009). Durante la primera fase virémica hay una infección generalizada de tejidos linfoides con depleción linfoide, linfopenia y fiebre transitoria. La profunda inmunosupresión es debida a la necrosis leucocitaria, apoptosis y disfunción. Una segunda viremia está asociada con fiebre alta e infección de los parénguimas tisulares como los del tracto respiratorio, digestivo, piel y SNC. Dando diferentes manifestaciones clínicas como conjuntivitis, descarga nasal, anorexia, signos respiratorios (producidos por la neumonía intersticial y la rinitis), gastrointestinales (vómitos, diarrea y deshidratación) y neurológicos, empeorando por infecciones bacterianas secundarias (Summers y Appel et al. 1994, Beineke et al. 2009). Las manifestaciones dérmicas incluven dermatitis pustular, hiperqueratosis de almohadilla plantar y nasal. En animales jóvenes también se ha descrito la hipoplasia del esmalte dentario y osteosclerosis metafisaria post-infección (Martella et. al 2008). Los signos neurológicos dependen de la distribución viral en el SNC, incluyen hiperestesia, rigidez cervical, convulsiones, signos cerebelosos y vestibulares, paraparesia o tetraparesia con ataxia sensorial (Beineke et al. 2015). siendo las mioclonías un signo casi patognomónico de la enfermedad (Tipold et al. 1992). En la mayoría de los casos, los caninos con sintomatología nerviosa no sobreviven, aunque algunos pocos se recuperan quedando con secuelas neurológicas (Beineke et al. 2009).

## 1.2. Patogenia de la invasión viral

La neuroinvasión del VDC ocurre principalmente por vía hematógena, donde las células mononucleares de la sangre periférica que transportan el virus atraviesan la barrera hematoencefálica infectando las células epiteliales y endoteliales residentes (Beineke et al. 2009, Rendon-Marin et al. 2019, Lempp et al. 2014). La otra vía descrita demuestra que el virus avanza desde el LCR hacia el SNC, por medio de las células neuro-ependimales que recubren la pared ventricular, y por las neuronas del hipocampo y la corteza que se encuentran adyacentes al área ventricular. Luego la infección se extiende por el parénquima y la corteza cerebral (Rendon-Marin et al. 2019). Por otro lado, la diseminación del virus a través del nervio olfatorio fue descrita en hurones mediante infección experimental (Rudd et al. 2006).

La infección comienza en el endotelio capilar o venular, posteriormente se disemina hacia los pericitos adyacentes, pies astrocíticos y células meníngeas (Axthelm y Krakowka 1987), siendo los astrocitos las principales células infectadas por el VDC en etapas tempranas (Beineke et al. 2009). Luego que se infectan los astrocitos ocurre un patrón arborescente con una transmisión de la infección a las neuronas adyacentes. La afección del parénquima es progresiva y se caracteriza por el

agrandamiento y confluencia de múltiples focos infecciosos. La infección del plexo coroideo coincide con la infección progresiva del parénquima, ésta, junto con la acumulación de leucocitos positivos a VDC, pueden influir en el desarrollo de la desmielinización peri-ventricular asociada al VDC (Axthelm y Krakowka 1987).

La leucoencefalomielitis desmielinizante (LD) es la mayor manifestación del VDC, ésta predomina en cerebelo y regiones peri-ventriculares (Beineke et al. 2009), por lo tanto, esta enfermedad es utilizada como modelo animal de desmielinización espontánea para estudiar diferentes enfermedades en humanos, como es la esclerosis múltiple y desmielinización por el virus del sarampión humano (Seehusen et al. 2016, Verdes et al. 2024).

La primera fase de desmielinización es atribuida al efecto directo del virus, es decir a la abundante carga, expresión y transcripción viral. Las lesiones en la sustancia blanca se caracterizan por una activación de las células microgliales, seguida de una reacción inmune, con desmielinización inflamatoria como consecuencia de la interacción entre macrófagos y anticuerpos (von Rüden et al. 2012). En las últimas etapas de la enfermedad, la leucoencefalitis desmielinizante se produce a causa de procesos inmunopatológicos como la respuesta glial y la degeneración axonal temprana. La disminución del título viral, la alteración de la maduración de los astrocitos, la axonopatía primaria y un probable papel de la regeneración mediada por células de Schwann son eventos cruciales en la LD (Rendon-Marin et al. 2019).

# 1.3. Mecanismos propuestos de desmielinización en la

## leucoencefalitis

La lesión axonal primaria conduce a alteraciones en el citoesqueleto y alteración en los mecanismos de transporte axonal. El daño axonal ocasiona pérdida de mielina secundaria, pudiendo inducir la muerte de los oligodendrocitos debido a la pérdida del soporte trófico. Otro mecanismo, aunque menos frecuente es la infección viral primaria en oligodendrocitos, causando distrofia y una reducida traducción de proteínas de mielina que conduce a la desmielinización. La injuria a nivel axonal y en la mielina activan la microglia, ocasionando la fagocitosis de los fragmentos de mielina y la presentación de antígenos virales y auto-antígenos, desencadenando potencialmente otra cascada de desmielinización autoinmune por propagación de epítopes. Las astroglias y microglias activadas como los leucocitos atraídos desde la sangre periférica pueden producir citocinas pro- y anti-inflamatorias pudiendo favorecer la neurodegeneración o neuroregeneración, respectivamente (Lempp et al. 2014).

## 1.4. Patogenia de la reacción glial frente a la neuroinvasión del VDC

## 1.4.1. Reacción astrocitaria

En la encefalitis canina por Distemper, la desmielinización de la sustancia blanca es seguida por la hipertrofia astrocítica (Summers y Appel 1994) y ocasionalmente por la formación de sincitios astrocíticos, gemistocitos reactivos y gliosis isomórfica (Summers et al. 1984). Los astrocitos representan el objetivo principal del VDC en etapas tempranas de la enfermedad (Mutunelli et al. 1988, Seehusen et al. 2007, Beineke et al., 2009).

Una de las principales funciones de los astrocitos en el SNC es mantener normal el intercambio con la circulación sanguínea, ya que es un importante componente de la Barrera Hemato-Encefálica (BHE). Se cree que los astrocitos influyen en la desmielinización ya que producen disturbios en la circulación sanguínea induciendo directamente desórdenes metabólicos en los oligodendrocitos (Pan et al. 2013).

Los astrocitos son células que responden rápidamente ante una amplia variedad de injurias del tejido nervioso (Orsini et al. 2007). Expresan 3 tipos de filamentos intermedios: GFAP (Proteína Ácida Fibrilar Glial -Glial Fibrillary Acidic Protein-), vimentina y nestina. La vimentina y la nestina son los principales filamentos intermedios en las células astrogliales inmaduras, mientras que los astrocitos adultos sólo contienen GFAP. La expresión de GFAP y vimentina es observada en los astrocitos activados en traumatismos, tumores o desórdenes neurológicos. La expresión de GFAP y vimentina es necesaria para la formación de la cicatriz glial, la cual constituye una barrera mecánica y química para bloquear la regeneración nerviosa y el crecimiento axonal (Menet et al. 2001). Los astrocitos positivos a GFAP forman células multinucleadas gigantes sincitiales (Seehusen et al. 2007, Lempp et al. 2014). Un aumento de la inmunomarcación GFAP durante los procesos de injuria del tejido nervioso indica reactividad astrocitaria. Las citocinas pro-inflamatorias como INFY y FNTa que son liberadas por los astrocitos, son potencialmente nocivas para la mielina y los oligodendrocitos, pudiendo desencadenar el proceso de desmielinización. Por lo tanto, el VDC podría activar en los astrocitos funciones inflamatorias para intentar combatirlo, causando una desmielinización como efecto secundario (Seehusen et al. 2007, Orsini et al. 2007). En resumen, la responsabilidad de los astrocitos en la disfunción nerviosa ha sido demostrada y evaluada mediante la expresión de GFAP, usada para identificar tanto la hipertrofia (astrocitosis), como la restricción de la proliferación astrocítica, variando según la edad del animal, el tipo de lesión y la región cerebral afectada (Headley et al. 2001).

## 1.4.2. Reacción microglial

Las células microgliales conforman el 5-20% de la población de células gliales del SNC. Son células inmunes residentes del SNC las cuales son activadas en diferentes desórdenes neurológicos. Proliferan y migran hacia la lesión, fagocitando células necróticas o apoptóticas, previniendo la liberación de sustancias inflamatorias o tóxicas, disminuyendo de esta manera la progresión de la enfermedad (Wang et al. 2021). Se encuentra en las meninges, plexo coroideo y espacios perivasculares. Recientemente se ha descubierto que se encuentran asociadas a enfermedades neurodegenerativas desempeñando un rol protector (Silvin et al. 2022).

El fenotipo microglial depende del estado de activación, la microglia ramificada se puede diferenciar de las células activadas al mostrar un aumento o nueva expresión de marcadores de superficie (Streit et al. 1999). La activación de la microglia juega un rol fundamental en la defensa y reparación de tejidos en el SNC en enfermedades infecciosas e inflamatorias, trauma, isquemia y neurodegeneración (Ohsawa et al. 2004, Dissing-Olesen et al. 2007).

Dicha activación incluye cambios morfológicos, ya que pasa de ser una célula altamente ramificada a ser una célula con comportamiento ameboide y cambios inmunofenotípicos, donde se produce la liberación de mediadores anti inflamatorios y proliferación celular. La injuria neuronal desencadena la hipertrofia de la microglia, disminución de las ramificaciones distales, movimientos de células o de procesos celulares hacia las neuronas dañadas (Dissing-Olesen et al. 2007, Wolf et al. 2017). En condiciones neurodegenerativas, la microglia reacciona a proteínas mal plegadas, agregados y desechos celulares (Wolf et al. 2017).

Stein et al. (2004) evidencian que la microglia activada representa una fuente importante de especies reactivas de oxígeno (ROS) en la etapa aguda de la enfermedad. Los oligodendrocitos exhiben una vulnerabilidad selectiva frente a ROS, y la mielina es sensible a la peroxidación lipídica inducida por ROS, por lo tanto, puede contribuir directamente a la destrucción de mielina o al daño oligodendroglial. Las células microgliales infectadas por VDC son capaces de presentar antígenos a través de las moléculas de MHC y CD1c y expresar moléculas co-estimuladoras para la activación de células T (Stein et al., 2004).

La molécula adaptadora de unión al calcio ionizado (Iba1), es una proteína *EF-hand* de 17kDa fijadora de calcio que se expresa únicamente en la microglia y los macrófagos. Tiene una actividad de agrupación de actina y participa en la formación de membranas y en la fagocitosis. La expresión de Iba1 en la microglia activada se ve luego de la isquemia y en enfermedades cerebrales severas (Ohsawa et al. 2004).

En resumen, en la enfermedad del SNC la microglia fagocita células apoptóticas, detritos de mielina y sinapsis dañadas, jugando un rol importante en la resolución de la neuroinflamación y la remoción de células apoptóticas. Una fagocitosis reducida o excesiva contribuye a la muerte celular y disfunción en el circuito sináptico, desmielinización, llevando a una exacerbación de la enfermedad nerviosa. Los desechos de mielina inhiben la remielinización, por lo tanto, la microglia debe eliminarlos rápidamente (Wang et al. 2021).

Se cree que la microglía en la esclerosis múltiple está sobre-activada y conduce a la fagocitosis de mielina. Por el contrario, se piensa que la microglia en la enfermedad de Alzheimer se vuelve menos eficaz en la limpieza de los desechos, lo que lleva a la acumulación de proteínas y en última instancia, a la neurodegeneración (Hendrickx et al. 2017).

## 1.5. Modulación intracelular del calcio en neuronas y su alteración

## en la patogenia de la neurodegeneración

El calcio es un segundo mensajero ubicuo almacenado en mitocondrias y retículo endoplásmico (RE) que se encuentra en distintos tipos celulares, incluidas las neuronas, regulando en ella diversas funciones como la transmisión sináptica, la plasticidad y la supervivencia. Un desequilibrio en la homeostasis del calcio puede provocar fallas sinápticas y deterioro cognitivo, muerte neuronal y su alteración está presente en varias enfermedades neurodegenerativas. Se sabe que el calcio se encuentra involucrado en procesos como la diferenciación, proliferación y apoptosis celular, así como en la liberación de neurotransmisores y la excitabilidad de la membrana neuronal (Jung et al. 2020).

La calbindina D-28k (CB) junto a la calretinina (CR) y parvalbumnia (PV) son proteínas de unión al calcio. La CB posee distribución citosólica principalmente, aunque también ha sido descrita su localización nuclear. Las células de Purkinje son las únicas neuronas cerebelares que expresan CB tanto en el soma, árbol dendrítico y axones, siendo esta proteína esencial para la homeostasis del calcio en estas neuronas (Schwaller et al. 2002, Vigot et al. 2004). Una disminución en la expresión de Calbindina puede conducir a una falla en la homeostasis intraneuronal del calcio, contribuyendo a efectos citotóxicos irreversibles durante el envejecimiento y en la patogenia de enfermedades neurodegenerativas, por lo tanto, la calbindina puede tener un efecto neuroprotector, siendo fundamental para la supervivencia celular (lacopino y Christakos 1990). El número de neuronas inmunopositivas a CB se encuentra reducido en enfermedades como el Alzheimer, Esclerosis Lateral Amiotrófica y demencia (Jung et al. 2020).

El RE desempeña un rol fundamental en los procesos de infección viral, ya que los virus lo utilizan para completar ciertos ciclos de su vida, como su ingreso a las células huésped, la síntesis y las modificaciones de proteínas virales, la replicación

del genoma y el ensamblaje del virus. Los virus alteran la homeostasis del RE, generando estrés y pudiendo causar una amplia variedad de enfermedades neurodegenerativas. Si las células no logran recuperar la homeostasis cálcica del RE, se inicia una cascada apoptótica intrínseca que se asocia a la patogénesis viral (Li et al. 2015). Existe evidencia de que un gran número de virus son capaces de provocar estrés en el RE durante su infección, siendo uno de ellos el virus del Distemper Canino (Brunner et al. 2012). Se ha visto que a medida que progresa la infección por VDC existe una pérdida en la cantidad de células de Purkinje y un aumento en la distancia entre ellas (Rudd et al. 2010).

## 1.6. Estadificación de los hallazgos histopatológicos en el SNC de

#### caninos infectados por el VDC

Histopatológicamente, las lesiones cerebelosas se han clasificado basándose en teñidas con hematoxilina-eosina (HE), con la muestras adición de inmunohistoquímica, transcriptómica y varios otros métodos. Trabajos previos clasificaron las etapas de las lesiones histopatológicas como agudas, subagudas y crónicas. La lesión aguda se caracteriza por vacuolización focal, mínima gliosis, sin desmielinización, cuerpos de inclusión y células positivas a VDC. La lesión subaguda presenta pérdida de mielina progresiva, focos de desmielinización, gliosis extensa, necrosis neuronal, infiltración mononuclear perivascular (manguitos perivasculares) de 2-3 capas de células de espesor, cuerpos de inclusión y células VDC positivas, mientras que la lesión crónica es similar a la subaguda, pero se evidencia un aumento de degeneración y necrosis neuronal con infiltración perivascular de más de 3 capas celulares (Summers et al. 1979, Vandevelde et al. 1981, Alldinger et al. 2000, Gröters et al. 2005, Seehusen et al. 2007, Lempp et al. 2014, Ulrich et al. 2014, Spitzbarth et al. 2016, Feijóo et al 2021).

## 2. HIPÓTESIS:

Los principales hallazgos histopatológicos cerebelosos ocasionados por la infección natural con el VDC en cada una de las etapas, pueden explorarse usando Luxol Fast Blue (LFB) para categorizar la desmielinización, y la inmunohistoquímica contra marcadores específicos de las células implicadas en estos procesos.

## 3. OBJETIVOS

## 3.1. Objetivo general:

Estudiar las alteraciones histopatológicas e inmunohistoquímicas ocasionadas por la infección natural con el Virus del Distemper Canino en perros domésticos, aclarando la relación entre la desmielinización, las células gliales y las células de Purkinje en cada etapa de la enfermedad.

## 3.2. Objetivos específicos:

- Subdividir las etapas de la enfermedad en: aguda, subaguda (1), subaguda (2), subaguda (3) y crónica, agregando el grado de demielinización mediante la tinción especial de LFB, a partir de la clasificación convencional de agudo a crónico.
- Analizar la relación entre la desmielinización y las distintas células gliales en cada etapa, mediante la realización de técnicas de Inmunohistoquímica, en astrocitos (GFAP) y en microglía (Iba-1).
- Investigar los cambios en las células de Purkinje en cada etapa de la enfermedad a través de la inmunomaración contra Calbindina (CB).

## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

## 4.1. Población animal

En este estudio se utilizaron muestras de 28 caninos infectados naturalmente por el VDC. De los cuales, 18 de ellos fueron remitidos para autopsia a la Unidad Académica de Patología, Facultad de Veterinaria, Udelar (Montevideo, Uruguay) en el período comprendido entre enero 2019 y marzo 2022, provenientes del Hospital de Facultad de Veterinaria y clínicas veterinarias particulares. Sus remitentes informaron que mostraban signos clínicos compatibles con dicha infección. Se realizó la autopsia de rutina, fotografía, toma de muestras y redacción de informe con los hallazgos encontrados. Se recolectaron muestras en formol tamponado al 10% para su procesamiento histológico de: hemisferio cerebral derecho, globos oculares y nervios ópticos, médula espinal, corazón, pulmón e hígado, también se recolectaron muestras para la realización de la técnica RT-PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa precedida de Retro-Transcripción) por el laboratorio de Microbiología de: hemisferio cerebral izquierdo, líquido cefalorraquídeo y orina. Además, se utilizaron otras 10 muestras de cerebelo previamente obtenidas de casos de animales con Distemper canino, que pertenecen al archivo de muestras de la Unidad Académica de Patología. El rango de edad de los animales utilizados fue de 25 días a 10 años, siendo 15 machos y 13 hembras, en su mayoría animales sin raza definida (cruza). La confirmación de la positividad al virus se realizó mediante la técnica de inmunohistoquímica y en algunos de ellos, se complementó el estudio por identificación del genoma viral mediante RT-PCR. Asimismo, considerando la edad de los perros infectados con VDC, se seleccionaron como grupo control 6 caninos normales, con otras causas de muerte, con edades comprendidas entre 45 días y 9 años. En el grupo control se excluyeron enfermedades infecciosas como causa de muerte y las pruebas inmunohistológicas o de RT-PCR fueron negativas en todos los casos.

## 4.2. Procesamiento de material

Para este trabajo se realizaron 5 cortes seriados del encéfalo, para su posterior inclusión en bloques de parafina. Los niveles de corte fueron: lóbulo frontal, hipotálamo intermedio, colículo rostral, pedúnculo cerebelar rostral, y núcleo olivar, según Canine Brain Transections College of Veterinary Medicine, University of Minnesota (http://vanat.cvm.umn.edu/brainsect/index.html). Estos cortes fueron deshidratados en concentraciones crecientes de alcohol isopropílico, dejados en xilol durante toda la noche y embebidos en parafina, para la confección de bloques y su posterior corte en micrótomo rotatorio manual (Slee CUT 4062, Alemania). Se realizaron cortes seriados de 5  $\mu$ m de espesor a nivel del vermis cerebeloso y cuerpo trapezoidal, ya que existen trabajos previos como los de Silva et al. (2009) y Feijoó et al. (2021) que indican que la distribución de las lesiones histopatológicas, son más severas y de mayor prevalencia en el cerebelo.

## 4.3. Análisis histopatológico e inmunohistoquímico

Las secciones de tejido incluidas en parafina y cortadas a 5 µm fueron montadas en láminas salinizadas (StartFrost, Alemania), las cuales quedaron durante toda la noche en la estufa a 61°C para su secado, luego fueron coloreadas con la tinción de rutina de Hematoxilina y Eosina (HE) y con la tinción especial Luxol Fast Blue (LFB) (ver anexos I y II).

La técnica de inmunohistoquímica implica una combinación de procesos inmunológicos y químicos. Cuando se produce la unión antígeno-anticuerpo se desencadena una reacción histoquímica la cual es visualizada mediante microscopía óptica (Ramos-Vara & Borst, 2016).

Para la técnica de inmunohistoquímica se realizó la reducción de la actividad de peroxidasa endógena con Peroxidazed 1 (Peroxide Blocking Reagent 901-PX968-031523, Biocare Medical, USA) durante 5 minutos. La recuperación antigénica fue inducida por calor, para ello, se utilizó una vaporera (Ternal) durante 30 minutos a 95°C, en la cual las láminas fueron sumergidas en una solución buffer, Borg Decloaker-RTU, (Antigen Retriveral 901-BD1000-060223 Biocare Medical, USA), luego se dejaron las láminas en dicha solución 20 minutos a temperatura ambiente. La incubación de los anticuerpos primarios se realizó en cámara húmeda durante toda la noche a 4° C. El revelado de la inmunopositividad se realizó con la incubación del cromógeno 3,3' diaminobencidina (DAB Chromogen Kit 901-DB801-032118 Biocare Medical, USA), visualizándose la unión antígeno-anticuerpo como un precipitado marrón que es insoluble en alcohol y xilol. La técnica se realizó tal como la describió Fairley et al. (2015) (ver anexo III).

Los controles negativos fueron realizados usando secciones duplicadas, en las que se aplicó PBS en lugar del anticuerpo primario.

Para la técnica de inmunohistoquímica, se utilizaron diversos anticuerpos y sistemas de detección que se detallan en la tabla 1.

## Tabla 1

## Especificación de anticuerpos y sistemas de detección utilizados

Anticuerpo	Marca	Dilución	Origen	Sistema de	
				detección	
MCA 1989 Canine	Biorad	1:250	Ratón	Mouse on canine	
Distemper			monoclonal	HRP-Polymer	
Virus					
Glial Fibrillary Protein	Biocare	RTU*	Ratón	MACH 4 Universal	
(GFAP)	Medical		monoclonal	HRP-Polymer	
Anti-Iba1 (ab5076)	Abcam	1:1000	Cabra	Rabbit Anti-Goat	
			policlonal	lgG H&L (HRP)	
				ab6741	
Calbindin (orb5912)	Biorbyt	1:200	Conejo	MACH 4 Universal	
			policlonal	HRP-Polymer	

\*(pronto para usar -*Ready To Use*-)

## 4.4. Captura y análisis de imágenes

Todas las láminas histológicas fueron escaneadas con el equipo Motic Easy Scan One para su posterior análisis, las imágenes fueron visualizadas y capturadas a través del software Motic DSAssistant (Motic VM V1 Viewer 2.0, versión 2019-08-02, China).

Se llevó a cabo el recuento de astrocitos, microglia y células de Purkinje en cortes de cerebelo canino, basándonos en los resultados de las diferentes inmunohistoquímicas.

El conteo se realizó de forma manual en imágenes capturadas en campos de 400x para astrocitos y microglias. La región examinada incluyó la región del cuarto ventrículo y la sustancia blanca central, capturando dos imágenes por animal, una para cada zona. Para el conteo de las células de Purkinje, se utilizó una imagen de una folia cerebelosa por animal, en campos visualizados a 40x.

## 4.5. Análisis estadístico

El análisis estadístico se llevó a cabo utilizando GraphPad Prism (versión 10.1.1 (323)) for Windows 64-bit, GraphPad Software, Boston, Massachusetts USA, <u>www.graphpad.com</u>). Se emplearon pruebas de ANOVA de una vía, seguidas de comparaciones múltiples, utilizando el test de Tukey para evaluar la diferencia entre los grupos. Los datos se presentan como medias ± desviación estándar. El nivel de significación estadística utilizado en todos los estudios fue de *p* ≤ 0.05.

#### 5. RESULTADOS

#### 5.1. Estadificación de la enfermedad

A partir de la tinción de HE clasificamos los estadios de las lesiones histopatológicas como agudas, subagudas o crónicas según estudios previos (Summers et al., 1979; Vandevelde et al., 1981: Alldinger et al., 2000: Gröters et al., 2005: Seehusen et al., 2007: Lempp et al., 2014: Ulrich et al., 2014: Spitzbarth et al., 2016). Es decir, las lesiones agudas se caracterizan por vacuolización focal, gliosis, cuerpos de inclusión y células CDV positivas. Las lesiones subagudas presentaban desmielinización, gliosis, necrosis. infiltración mononuclear perivascular (manguitos) de dos a tres capas de espesor, cuerpos de inclusión y células CDV positivas, mientras que las lesiones crónicas fueron similares a la etapa subaguda. pero la infiltración perivascular fue más prominente, de al menos tres capas de espesor.

#### 5.2. Grado de desmielinización

Subdividimos los cambios subagudos según el grado de desmielinización determinado por la tinción con LFB para aclarar la relación entre la desmielinización y otros cambios observados.

La etapa aguda fue un grupo en el cual no se observó desmielinización al igual que en los animales del grupo control (Figs. 1 y 2), la etapa subaguda (1) fue un grupo en el que la desmielinización fue inferior al 30% de toda la muestra (Fig. 3), la etapa subaguda (2) fue un grupo en el que la desmielinización fue del 30 al 70% (Fig. 4), y subaguda (3) fue un grupo en el que la desmielinización fue del 70% o más (Fig. 5). Mientras que en el grupo crónico la desmielinización es muy marcada (Fig.6) Es decir, clasificamos la enfermedad en grupos agudos, subagudos (1), subagudos (2), subagudos (3) y crónicos según la tinción HE y LFB. Como resultado, los 28 perros con infección por CDV se subdividieron en 4 casos agudos, 4 casos subagudos (1), 9 casos subagudos (2), 5 casos subagudos (3) y 6 casos crónicos.



Figura 1. Animal normal perteneciente al grupo control. Cerebelo. No se observa desmielinización. LFB. Escala = 60 μm



Figura 2. Animal perteneciente al grupo agudo. Cerebelo. No se aprecia desmielinización. LFB. Escala =  $60 \mu m$ .



Figura 3. Animal perteneciente al grupo subagudo (1). Cerebelo. Se observa ligera desmielinización. LFB. Escala =  $60 \mu m$ .



Figura 4. Animal perteneciente al grupo subagudo (2). Cerebelo. La desmielinización es evidente. LFB. Escala = 100  $\mu$ m.


Figura 5. Animal perteneciente al grupo subagudo (3). Cerebelo. La desmielinización progresa. LFB. Escala = 100  $\mu$ m.



Figura 6. Animal perteneciente al grupo crónico. Cerebelo. La desmielinización es severa. LFB. Escala = 100  $\mu$ m.

## 5.3. Relación entre cada etapa de la enfermedad, edad y sexo

No se observó una relación entre la etapa de la enfermedad y la edad de los animales, tampoco existió una tendencia clara donde los casos agudos estuvieran asociados con los animales jóvenes, ni que los crónicos estuvieran ligados a animales de mayor edad. Por ejemplo, un animal murió a los 45 días de edad en la etapa crónica. Tampoco hubo relación entre cada etapa y el sexo. La mayoría de los caninos eran sin raza definida, y no se identificó ninguna asociación entre la etapa de la enfermedad y una raza específica. De igual forma, en los animales del grupo control, la cantidad de astrocitos, microglia y células de Purkinje no presentaron relación con la edad, raza, sexo o peso corporal.

## 5.4. Hallazgos histopatológicos e inmunohistoquímicos

Histológicamente las principales lesiones observadas fueron: desmielinización, reacción de células gliales, reducción del número de células de Purkinje y meningitis.

En el grupo agudo, todos los animales sometidos a la prueba de PCR fueron positivos. No se observó desmielinización ni vacuolas mediante las tinciones con HE y LFB. Se observó inmunomarcación contra el VDC en astrocitos, microglia, neuronas, piamadre y plexo coroideo. En todos los casos se evidenció inmunopositividad contra el VDC en la sustancia blanca adyacente al cuarto ventrículo (Fig. 7). También se observó inmunoreactividad contra el virus en las células endoteliales de los vasos sanguíneos (Fig.8), células mononucleares dentro y fuera de los vasos sanguíneos de la sustancia blanca alejada del cuarto ventrículo (Fig.9), en la sustancia blanca de los lóbulos cerebelosos y en células de la capa granular (Fig.10).



Figura 7. Animal perteneciente al grupo agudo. Inmunopositividad al Virus de Distemper Canino, en el parénquima subventricular. Tinción inmunohistoquímica para VDC. Escala = 60 µm.



Figura 8. Animal perteneciente al grupo agudo. La inmunomarcación contra el VDC se observa principalmente en los astrocitos alrededor de los vasos sanguíneos, células endoteliales vasculares y células mononucleares intravasculares. Tinción inmunohistoquímica para VDC. Escala = 30 µm.



Figura 9. Animal perteneciente al grupo subagudo (3). Se observa importante inmunomarcación contra el VDC en las células alrededor de los vasos sanguíneos de la sustancia blanca cerebelosa. Escala =  $100 \mu m$ .



Figura 10. Animal perteneciente al grupo subagudo (3). Se observa inmunomarcación positiva contra el VDC en las tres capas de la corteza cerebelosa (molecular, de Purkinje y granular) y en la sustancia blanca cerebelosa. Escala = 300 μm.

Se observaron inclusiones virales nucleares y citoplasmáticas principalmente en astrocitos, microglia y piamadre. En el grupo agudo no hubo un aumento significativo en el número de astrocitos y microglia en comparación con el grupo control. Sin embargo, se detectó un aumento en el tamaño de los astrocitos.

En el grupo subagudo (1), los cambios fueron similares a los del grupo agudo, siendo evidente la desmielinización mediante la tinción con LFB. Donde se observaron cambios en la sustancia blanca adyacente al cuarto ventrículo. En uno de los animales se observó que el VDC infiltraba desde la piamadre hacia la sustancia gris y también se vio inmunopositividad del virus en las células de Purkinje y células de la capa granular (Fig. 10). A pesar de que no hubo un aumento significativo en el número de astrocitos y microglia en comparación con el grupo agudo, dichas células se observaron de mayor tamaño.

En el grupo subagudo (2), la desmielinización fue observada en la sustancia blanca adyacente al cuarto ventrículo, y además se observó en la sustancia blanca de los lóbulos en más de la mitad de los casos. La desmielinización y los cambios asociados en los astrocitos y la microglia progresaron alrededor de los vasos sanguíneos, de modo que las áreas de desmielinización se dispersaron por toda la sustancia blanca. Aunque no hubo un aumento significativo en la cantidad de astrocitos y microglia en comparación con los grupos agudo y subagudo (1), se observaron astrocitos gemistocíticos, astrocitos multinucleares, gliosis fibrilar y microglia en forma de bastones (Fig 11). También aparecieron células espumosas en las zonas donde avanzaban los cambios. La tinción con LFB reveló hinchazón, colapso y desaparición de la vaina de mielina. La inmunomarcación contra el VDC y los cuerpos de inclusión aumentaron en comparación con el grupo subagudo (1).



Figura 11. Animal perteneciente al grupo subagudo (2). Se detecta un aumento en el tamaño de los astrocitos, se observan células multinucleadas e inclusiones virales nucleares en la sustancia blanca del cerebelo con desmielinización. HE. Escala =  $30 \ \mu m$ .

En el grupo subagudo (3), los cambios progresaron y el área de desmielinización aumentó y se extendió por toda la sustancia blanca. No se observó un aumento significativo en el número de astrocitos, pero si se vieron muchos astrocitos gemistocíticos y astrocitos multinucleares. Además, aumentó la inmunomarcación del VDC y los cuerpos de inclusión. Los linfocitos, células plasmáticas, monocitos y macrófagos se encontraban agregados alrededor de los vasos sanguíneos, formando de 1 a 2 capas de células.

En el grupo crónico progresaron los cambios como la desmielinización, se vio un aumento significativo en el número e hinchamiento de los astrocitos (Fig.12) un aumento de la inmunomarcación contra VDC y un aumento de los cuerpos de inclusión. Los manguitos perivasculares mostraron tres o más capas celulares (Fig. 13).

Se observó meningitis en 1 caso subagudo (1), 3 subagudos (2), 3 subagudos (3) y 3 crónicos.



Figura 12 Se evaluaron las diferencias significativas entre la cantidad de astrocitos con inmunomarcación positiva contra GFAP en la región del cuarto ventrículo y sustancia blanca central entre los grupos de animales control, agudo, subagudo (1), subagudo (2), subagudo (3) y crónico. Observándose diferencias estadísticamente significativas entre el grupo control vs crónico p=0.0002.





Figura 13. Animal perteneciente al grupo crónico. La desmielinización en la sustancia blanca del cerebelo es evidente alrededor de los vasos sanguíneos, que muestran infiltrado mononuclear perivascular. LFB. Escala = 90 µm.

La inmunomarcación contra GFAP se observó de tipo difusa por todo el tejido. A medida que fue avanzando la enfermedad se observaron astrocitos gemistocíticos, hipertróficos y gliosis fibrilar, evidenciándose como una red densa de prolongaciones citoplasmáticas ricas en GFAP (Fig. 14 y 15). En la etapa crónica en el centro de los focos de desmielinización se observó una disminución en la expresión de GFAP.



Figura 14. Animal perteneciente al grupo control. Se observa inmunomarcación para GFAP. Escala= 50µm



Figura 15. Animal perteneciente al grupo crónico. Se observa inmunomarcación para GFAP, evidenciando aumento del volumen citoplasmático en astrocitos. Escala= 50µm

En cuanto a las células de la microglia observamos principalmente cambios a nivel fenotípicos ya que no existieron modificaciones significativas en la cantidad de células microgliales en las diferentes etapas de la enfermedad (Fig. 16). La inmunomarcación contra iba-1 en los animales del grupo control se observó de tipo dispersa en plexo coroideo, meninges, corteza y parénquima cerebeloso y espacios perivasculares, las células de la microglia poseen una forma altamente ramificada. A medida que fueron avanzando las etapas de la enfermedad observamos cambios en las formas de la microglia, es decir, la célula pasa de ser altamente ramificada a tener una forma ameboidea (Fig. 17). La inmunomarcación perivascular pasa a ser más notoria. Se empiezan a observar ramificaciones más cortas y aparecen focos de intensa inmunomarcación en la sustancia blanca del parénguima cerebral. La distribución de estos coincide con la inmunomarcación contra el VDC (Figs 18 y 19). Las microglias que se encuentran contiguas a la región periventricular se observan de mayor tamaño y poseen forma redondeada. Llegando a la etapa crónica se ve poca inmunomarcación, las microglias no poseen ramificaciones y se observa poca inmunomarcación perivascular.



Figura 16. No se encontraron diferencias significativas entre la cantidad de microglias con inmunomarcación positiva contra lba1 en la región del cuarto ventrículo y la sustancia blanca central entre los grupos de animales control, agudo, subagudo (1), subagudo (2), subagudo (3) y crónico.



Figura 17. Animal perteneciente al grupo subagudo (2). Se observa inmunomaracción contra iba-1 en la región periventricular, las microglías presentan forma ameboidea. Escala= 60µm.



Figura 18. Animal perteneciente al grupo subagudo. Se observa inmunomarcación contra VDC en sustancia blanca cerebelosa. (2). Escala = 60  $\mu$ m.



Figura 19. Animal perteneciente al grupo subagudo (2). Se observa intensa inmunomarcación contra lba-1 en la sustancia blanca cerebelosa (mismo animal y región que figura 15). Escala =  $60 \mu m$ 

Se observaron cambios necróticos en la corteza cerebelosa, en algunas regiones no se observa tinción de la sustancia blanca, hay una importante disminución de las células de la capa granular y de las células de Purkinje (Fig. 20)



Figura 20. Animal perteneciente al grupo crónico. En algunas folias cerebelosas no se observa tinción de la sustancia blanca. Se observa disminución en el número de células de la capa granular y células de Purkinje. HE. Escala = 100 µm.

Con la tinción inmunohistoquímica contra Calbindina pudimos detectar una disminución significativa en la cantidad de células de Purkinje a medida que avanzan las etapas de la infección, en comparación con el grupo control (Figs. 21-23).



Figura 21. Animal perteneciente al grupo control. Se observa inmunomarcación positiva contra Calbindina en las células de Purkinje (tanto en el soma, proceso axonal y arborización dendrítica) de la corteza cerebelosa. Escala = 100 µm.



Figura 22. Animal perteneciente al grupo subagudo (3). Se observa inmunomarcación positiva contra Calbindina en las células de Purkinje en la corteza cerebelosa. Evidenciando una reducción en la cantidad de células de Purkinje. Escala = 100 µm.



Figura 23. Se evaluaron las diferencias significativas entre la cantidad de células de Purkinje con inmunomarcación positiva a Calbindina en la región del árbol cerebeloso entre los grupos de animales control, agudo, subagudo (1), subagudo (2), subagudo (3) y crónico. Observándose diferencias estadísticamente significativas entre el grupo control vs subagudo (2) (p=0.0144), control vs subagudo (3) (p= 0.0024) y entre los grupos control vs crónico (p=0.0163).

Grupo	Número	Edad	Hallazgos histopatológicos	
	de	(rango)		
	animales			
Control	5	(45 días– 6 años)	Sin cambios	
Agudo	4	(25 días – 3 años)	Reacción de células gliales, cuerpos de	
			inclusión, inmunomarcación positiva contra	
			VDC, meningitis	
Subagudo	4	(30 días – 3 años)	Desmielinización, reacción de células gliales,	
(1)			cuerpos de inclusión, inmunomarcación	
			positiva conta VDC, meningitis	
Subagudo	9	(2 meses–10 años)	Desmielinización, reacción de células gliales,	
(2)			cuerpos de inclusión, inmunomarcación	
			positiva VDC, meningitis, disminución de las	
			células de la capa granular, disminución de las	
			células de Purkinje	
Subagudo	5	(3 meses– 3 años)	Desmielinización, reacción de células gliales,	
(3)			cuerpos de inclusión, inmunomarcación conta	
			VDC, meningitis, disminución de las células de	
			la capa granular, disminución de las células de	
			Purkinje	
Crónico	6	(3 meses– 3 años)	Desmielinización, gliosis, reacción de células	
			gliales, cuerpos de inclusión, inmunomarcación	
			contra VDC, meningitis, disminución de las	
			células de la capa granular, disminución de las	
			células de Purkinje	

## Tabla 2. Resumen de los datos histológicos observados en cada etapa

Grupo	Media		
	Astrocitos	Microglias	Células de Purkinje
Control	35 ± 11	64 ± 19	49 ± 6
Agudo	41 ± 12	64 ± 13	42 ± 17
Subagudo (1)	42 ± 13	56 ± 16	25 ± 6
Subagudo (2)	36 ± 13	75 ± 26	24 ± 14
Subagudo (3)	32 ± 12	63 ± 26	15 ± 12
Crónico	63 ± 22	44 ± 17	23 ± 13

# Tabla 3. Recuento de los diferentes tipos celulares en cortes de cerebelo canino

Nota: los resultados son expresados como medias ± desviación estándar (SD)

## 6. DISCUSIÓN

Nuestros resultados confirman reportes previos de nuestro grupo (Feijóo et al. 2021) como desmielinización, reacciones en astrocitos, oligodendroglia y microglia, aparición de cuerpos de inclusión, reducción del número de células de Purkinie v degeneración de la capa granular. La desmielinización fue evidente con la tinción con LFB. En el grupo subagudo (1) la desmielinización se observó como una disminución en la tinción de HE. La desmielinización se observó mediante la vacuolización en el grupo subagudo (2) y en los grupos siguientes. Los astrocitos y la microglia se encontraban hipertróficos incluso en la etapa aguda, cuando no se observó desmielinización. Se ha informado que en las lesiones desmielinizantes del Distemper Canino, la mayoría (95%) de las células infectadas han sido identificadas como astrocitos, representando la célula diana de este virus (Summers et al. 1987, Mutinelli et al. 1989). Las reacciones astrocíticas y distribución de la inmunomarcación contra GFAP de este trabajo coinciden con reportes anteriores (Orsini et al. 2007, Seehusen et al. 2007). Los diferentes fenotipos observados en las microglias mediante la tinción contra Iba-1 coincidieron con los diferentes estados de activación, que variaron de una forma ramificada hasta una forma ameboide, tal como lo describe Hendrickx et al. 2017.

En este estudio, se observó inmunopositividad al VDC no sólo en los astrocitos, sino también en la microglía en la etapa inicial de la infección. Se ha reportado que los astrocitos y la microglia respondieron durante las primeras etapas de la infección, y también hay reportes que indican que su número aumentó (Klemens et al. 2019, Lempp et al. 2014, Ulrich et al. 2014). En esta investigación, hubo un aumento significativo en la cantidad de astrocitos en el grupo crónico en comparación al grupo control, mientras que la microglia no evidenció cambios significativos entre los diferentes grupos de infección. En ambos tipos celulares se observaron cambios morfológicos desde una etapa temprana y también se evidenció inmunopositividad contra el VDC en ellas. Está claro que la función normal se encuentra alterada. El hecho de que los cambios morfológicos en astrocitos y microglia, fueran un rasgo característico se considera información importante obtenida. Se han descrito varias funciones de los astrocitos, una de ellas es remover el exceso de neurotransmisores liberados en el espacio sináptico (por ejemplo: el glutamato), mediante transportadores específicos, y catalizar mediante la glutamina sintetasa la posterior degradación a glutamina (ciclo glutamato / glutamina), evitándose así, la excitotoxicidad celular, y la consecuente muerte de neuronas y oligodendrocitos productores de mielina (Seifert et al. 2006, Correale y Farez 2015). Observamos respuestas de los astrocitos antes de la desmielinización, por lo que es evidente que los astrocitos participan en los cambios de mielina desde las primeras etapas de la infección.

Los cuerpos de inclusión citoplasmáticos e intranucleares se pueden encontrar con frecuencia en lesiones agudas y subagudas (Seehusen et al. 2007). En esta

investigación, se observó inmunopositividad contra VDC y cuerpos de inclusión desde la etapa aguda, antes del inicio de la desmielinización, y progresaron con la etapa de la infección. Se ha informado que el antígeno viral puede desaparecer de las lesiones desmielinizantes inflamatorias debido a las respuestas inmunes antivirales en la encefalomielitis crónica por VDC (Muller et al. 1995, Koutinas et al. 2002). Sin embargo, las respuestas de los astrocitos y las células microgliales, el aumento de la inmunomarcación del virus dentro de estas células y la aparición de cuerpos de inclusión no disminuyeron hasta la etapa crónica en este estudio. Por lo tanto, está claro que los cambios en los astrocitos y las células microgliales aparecen en una etapa temprana y progresan con las siguientes etapas. Se han informado dos posibles rutas para la desmielinización: una ruta se inicia cuando el virus infecta los astrocitos, que luego infectan la oligodendroglia, y la otra ruta es cuando el virus infecta la microglia a través de los astrocitos y, en última instancia, afecta la oligodendroglia (Lempp et al. 2014). Los resultados actuales confirman esta posibilidad.

Los cambios se observaron inicialmente en la región periventricular y gradualmente se volvieron perivasculares en la sustancia blanca. Se dice que la región periventricular es la primer área que infecta el virus. La principal vía de entrada al SNC es a través de células mononucleares infectadas que cruzan la barrera hemato-encefálica, lo que provoca la liberación viral local y la posterior infección de las células epiteliales y endoteliales residentes. También se ha informado que el virus puede propagarse a través del cerebro una vez que ingresa al mismo. Infecta el LCR, las células del revestimiento ependimario de los ventrículos y, en última instancia, infecta las células gliales y las neuronas (Higgins et al. 1982, Axthelm y Krakowka et al. 1987, Summers et al. 1979, Frisk et al. 1999, Rudd et al. 2006). Por otro lado, también se observó desmielinización, reacciones astrocitarias y microgliales, y degeneración de mielina en la sustancia blanca del árbol cerebeloso del grupo subagudo (2). Además, en el grupo subagudo (1), se observó infiltración del VDC desde las leptomeninges hacia la sustancia gris. En estos casos, también se observó una respuesta astrocítica en la sustancia gris y la pérdida de células en la capa granular. En las folias cerebelosas, se encontró inmunomarcación contra VDC en astrocitos, células de Golgi y células de Purkinje. Se ha informado que la inmunomarcación del VDC se extiende desde las células piales hasta la sustancia gris subpial (Summers et al. 1984, Baumgärtner et al. 1989, Vandevelde y Zurbriggen 2005, Rudd et al. 2006, Beineke et al. 2009). Se confirmó la infección por el virus desde las leptomeninges hasta la sustancia gris y blanca en un reporte previo de nuestro grupo (Feijoó et al. 2021).

Evidenciamos cambios en las células de Purkinje, donde observamos una disminución significativa a partir del grupo subagudo (2) la cual progresó. Se pensaba que este hecho se debía no sólo a la influencia de la infección por VDC en la sustancia blanca sobre la sustancia gris, sino también a la infección del virus desde las leptomeninges hasta la sustancia gris y blanca. Se han informado efectos

sobre las células de Purkinje en infecciones virales en varios animales (Verdes et al. 2016, Wünschmann et al. 2021). También se ha observado vacuolización focal y apariencia esponjosa cerca de la capa de células de Purkinje en el cerebelo en perros con infección por VDC (Pan et al. 2013), y Rudd et al. (2010) también afirmaron que las células de Purkinje y las células de la capa granular son las células diana de la infección por VDC. Además, se han informado cambios en las células de Purkinje y en las de la capa granular en la infección por VDC en otras especies animales (Potgieter y Patton, 1984), y se han observado cambios en las células de Purkinje y en las células de la capa granular en un estudio experimental de la infección con VDC en hurones (Rudd et al. 2010). Con base en los informes anteriores y los resultados actuales, se puede decir que los cambios en las células de Purkinje y en las de la capa granular son una de las características diagnósticas de la infección por VDC.

Se ha analizado la edad y cada etapa de la enfermedad en función del estado inmunológico del perro. Se dice que los perros jóvenes o inmunocomprometidos muestran lesiones agudas, mientras que los perros maduros suelen desarrollar encefalomielitis crónica (Vandevelde et al. 1980, Thomas et al. 1993, Vandevelde y Zurbriggen 1995, Carvalho et al. 2010). En esta investigación no se midieron los anticuerpos en la sangre y además, puede haber un problema con la cepa del virus. Las muestras del grupo agudo se trataron de animales con edades comprendidas entre los 25 días hasta los 3 años de edad, mientras que un animal infectado de 10 años perteneció al grupo subagudo (2) y no al grupo crónico. Estos hechos sugieren que el estadio de las lesiones está relacionado con el estado inmunológico debido a varios factores, y parece poco probable que la edad por sí sola sea un factor asociado con cada estadio.

## 7. CONCLUSIONES

En conclusión, se observaron respuestas de astrocitos y células microgliales en una etapa temprana de la enfermedad, cuando la desmielinización aún no era evidente. Además, se observó inmunopositividad contra VDC y cuerpos de inclusión en varias células de la etapa aguda. Con la progresión de la desmielinización, se evidenció una disminución significativa de las células de Purkinje y cambios degenerativos en las células de la capa granular. Estos cambios fueron avanzando junto con las etapas de la enfermedad. No se encontró una relación clara entre la edad de los animales y cada etapa de la enfermedad.

## 8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1. Alldinger S, et al. Up-regulation of the hyaluronate receptor CD44 in canine distemper demyelinated plaques. Acta Neuropathol 2000; 99: 138-146.
- 2. Appel MJG, Summers BA. Pathogenicity of morbilliviruses for terrestrial carnivores. J Vet Med 1995; 45: 123-130.
- 3. Axthelm MK, Krakowka S. Canine distemper virus: the early blood-brain barrier lesion. Acta Neuropathol 1987; 75: 27-33.
- 4. Bathen-Noethen A, et al. Magnetic resonance imaging findings in acute canine distemper virus infection. J Small Anim Pract 2008; 49: 460-467.
- 5. Baumgärtner W, et al. Naturally occurring canine distemper virus encephalitis: distribution and expression of viral polypeptides in nervous tissues. Acta Neuropathol 1989; 78: 504-512.
- 6. Beineke A, et al. Cross-species transmission of canine distemper virus—an update. One health 2015; 1: 49-59.
- 7. Beineke A, et al. Pathogenesis and immunopathology of systemic and nervous canine distemper. Vet Immunol Immunopathol 2009; 127: 1-18.
- 8. Brunner JM, et al. Morbillivirus glycoprotein expression induces ER stress, alters Ca2+ homeostasis and results in the release of vasostatin. PloS one 2012; 7: e32803.
- 9. Carvalho OV, et al. Immunopathogenic and neurological mechanisms of canine distemper virus. Adv Virol 2012; 2012: 163860.
- 10. Correale J, Farez, MF. The Role of astrocytes in multiple sclerosis progression. Front Neurol 2015; 6: 180.
- 11. Day MJ, et al. Guidelines for the vaccination of dogs and cats. Compiled by the Vaccination Guidelines Group (VGG) of the World Small Animal Veterinary Association (WSAVA). J Small Anim Pract 2007; 48: 528-541.
- 12. De Nardo TFS, et al. Contribution of astrocytes and macrophage migration inhibitory factor to immune-mediated canine encephalitis caused by the distemper virus. Vet Immunol Immunopathol 2020; 221: 110010.
- 13. Dissing-Olesen L, et al. Axonal lesion-induced microglial proliferation and microglial cluster formation in the mouse. Neuroscience 2007; 149: 112-122.
- 14. Fairley RA, et al. Post-vaccinal distemper encephalitis in two Border Collie cross littermates. N Z Vet J 2015; 63:17-120.
- 15. Feijoó G, et al. Central nervous system lesions caused by canine distemper virus in 4 vaccinated dogs. J Vet Diagn Invest 2021; 33: 640-647.
- 16. Franco G, Puentes R. Pautas para la vacunación en caninos y felinos en Uruguay. Veterinaria (Montevideo) 2020; 56 (213).
- 17. Frisk AL, et al. Detection of canine distemper virus nucleoprotein RNA by reverse transcription-PCR using serum, whole blood, and cerebrospinal fluid from dogs with distemper. J Clin Microbiol 1999; 37: 3634-3643.

- 18. Gröters S, et al. Up-regulation of mRNA for matrix metalloproteinases-9 and
  -14 in advanced lesions of demyelinating canine distemper leukoencephalitis. Acta Neuropathol 2005; 110: 369-382.
- 19. Guardo GD, et al. Morbillivirus infections in aquatic mammals: a brief overview. J Vet Med Series A 2005; 52: 88-93.
- 20. Headley SA, et al. Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP)-immunoreactive Astrocytes in Dogs Infected with Canine Distemper Virus. J Comp Pathol 2001; 125: 90-97.
- 21. Hendrickx D A, et al. Staining of HLA-DR, Iba1 and CD68 in human microglia reveals partially overlapping expression depending on cellular morphology and pathology. J Neuroimmunol 2017; 309: 12-22.
- 22. Higgins RJ, et al. Primary demyelination in experimental canine distemper virus induced encephalomyelitis in gnotobiotic Dogs. Sequential immunologic and morphologic findings. Acta Neuropathol 1982; 58: 1-8.
- Iacopino AM, and Christakos S. Specific reduction of calcium-binding protein (28-kilodalton calbindin-D) gene expression in aging and neurodegenerative diseases. Proc Natl Acad Sci 1990 87(11) :4078-4082.
- 24. Jung E.-M, et al. Calbindin-D9k is a novel risk gene for neurodegenerative disease. Cell Physiol Biochem 2020; 54: 438-456.
- 25. Kabakci N, et al. Immunohistochemical investigation of cerebellum in dogs infected with canine distemper virus. Acta Veterinaria Hungarica 2004; 52: 327-337.
- 26. Klemens J, et al. Neurotoxic potential of reactive astrocytes in canine distemper demyelinating leukoencephalitis. Sci Rep 2019; 9:11689.
- 27. Koutinas AF, et al. Relation of clinical sings to pathological changes in 19 cases of canine distemper encephalomyelitis. J Comp Pathol 2002; 126: 47-56.
- 28.Lempp C, et al. New aspects of the pathogenesis of canine distemper leukoencephalitis. Viruses 2014; 6: 2571-2601.
- 29.Li S, et al. The expanding roles of endoplasmic reticulum stress in virus replication and pathogenesis. Crit Rev Microbiol 2015; 41: 150-164.
- 30. Martella V, et al. Canine distemper virus. Vet Clin of Small Anim 2008; 38: 787-797.
- 31. Menet V, et al. Inactivation of the glial fibrillary acidic protein gene, but not that of vimentin, improves neuronal survival and neurite growth by modifying adhesion molecule expression. J Neurosci 2001; 21: 6147-6158.
- 32. Muller CF, et al. Studies on canine distemper virus persistence in the central nervous system. Acta Neuropathol 1995; 89: 438-445.
- 33. Mutinelli F, et al. Astrocytic infection in canine distemper virus-induced demyelination. Acta Neuropathol 1989; 77: 333-335.

- 34.Noyce RS, et al. Dog nectin-4 is an epithelial cell receptor for canine distemper virus that facilitates virus entry and syncytia formation. Virology 2013; 436: 210-220.
- 35. Ohsawa K, et al. Microglia/macrophage-specific protein Iba1 binds to fimbrin and enhances its actin-bundling activity. J. Neurochem 2004; 88: 844-856.
- 36. Orsini H, et al. Marcação imunoistoquímica da expressão astrocitária de proteína glial fibrilar ácida e de vimentina no sistema nervoso central de cães com cinomose. Arq Neuro-Psiquiatr 2007; 65: 1070-1077.
- 37.Pan Y, et al. Pathogenesis of demyelinating encephalopathy in dogs with spontaneous acute canine distemper. J Integr Agric 2013; 12: 334-343.
- 38. Potgieter LN, Patton CS. Multifocal cerebellar cortical necrosis caused by canine distemper virus infection in a raccoon. J Am Vet Med Assoc 1984; 185: 1397-1399.
- 39. Ramos-Vara JA, & Borst, LB. Immunohistochemistry: Fundamentals and applications in oncology. In: Tumors in domestic animals. Meuten DJ (ed.), 5<sup>th</sup>. Edition, 2016. Springer. pp. 44-87.
- 40. Rendon-Marin et al. Tropism and molecular pathogenesis of canine distemper virus. J Virol 2019; 16, 30.
- 41. Rudd PA, et al. Acute canine distemper encephalitis is associated with rapid neuronal loss and local immune activation. J Gen Virol 2010; 91: 980-989.
- 42. Rudd PA, et al. Canine distemper virus uses both the anterograde and the hematogenous pathway for neuroinvasion. J Virol 2006; 80: 9361-9370.
- 43. Sarute N, et al. First genome sequence of a canine distemper virus strain from South America. Genome Announc 2014; 2: 10-1128.
- 44. Schwaller B, et al. 'New' functions for 'old' proteins: The role of the calciumbinding proteins calbindin D-28k, calretinin and parvalbumin, in cerebellar physiology. Studies with knockout mice. Cerebellum 2002; 1: 241-258.
- 45. Seehusen F, et al. Vimentin-positive astrocytes in canine distemper: a target for canine distemper virus especially in chronic demyelinating lesions? Acta Neuropathol 2007; 114: 597-608.
- 46. Seifert G, et al. Astrocyte dysfunction in neurological disorders: a molecular perspective. Nat Rev Neurosci 2006; 7: 194-206.
- 47. Silva MC, et al. Neuropatologia da cinomose canina: 70 casos (2005-2008). Pesq. Vet Bras 2009; 29: 643-652.
- 48. Silvin A, et al. Dual ontogeny of disease-associated microglia and disease inflammatory macrophages in aging and neurodegeneration. Immunity 2022; 55:1448-1465.
- 49. Spitzbarth I, et al. Immunohistochemical and transcriptome analyses indicate complex breakdown of axonal transport mechanisms in canine distemper leukoencephalitis. Brain Behav 2016; 3: e00472.
- 50. Stein VM, et al. Microglial cell activation in demyelinating canine distemper lesions. J Neuroimmunol, 2004; 153: 122-131.
- 51. Streit WJ, et al. Reactive microgliosis. Prog Neurobiol 1999; 57: 563-581.

- 52. Summers BA, Appel, MJ. Aspects of canine distemper virus and measles virus encephalomyelitis. J Comp Pathol 1994; 11:433-455.
- 53. Summers BA, et al. Canine distemper encephalomyelitis: variation with virus strain. J Comp Pathol 1984; 94: 65-75.
- 54. Summers BA, Appel, MJ. Demyelination in canine distemper encephalomyelitis: an ultrastructural analysis. J Neurocytol 1987; 16: 871-881.
- 55. Summers BA, et al. Early events in canine distemper demyelinating encephalomyelitis. Acta Neuropathol 1979; 46: 1-10.
- 56. Thomas WB, et al. A retrospective evaluation of 38 cases of canine distemper encephalomyelitis. J Am Anim Hosp Associ 1993; 29: 129-133.
- 57. Tipold A, et al. Neurological manifestations of canine distemper virus infection. J Small Anim Pract 1992; 33: 466-470.
- 58. Ulrich R, et al. Transcriptional changes in canine distemper virus-induced demyelinating leukoencephalitis favor a biphasic mode of demyelination. PLOS One 2014; 9: e95917.
- 59. Vandevelde M, et al. Immunoglobulins in demyelinating lesions in canine distemper encephalitis. An immunohistological study. Acta Neuropathol 1981; 54: 31-41.
- 60. Vandevelde M, Zurbriggen A. The neurobiology of canine distemper virus infection. Vet Micro 1995; 44: 271-280.
- 61. Vandevelde M, Zurbriggen A. Demyelination in canine distemper virus infection: A review. Acta Neuropathol 2005; 109: 56-68.
- 62. Verdes JM, et al. Histopathological Analysis of Brains from Dogs Infected with Canine Distemper Virus. In Measles and Related Morbilliviruses: Methods and Protocols. Ma D. y Pfaller, CK. (eds.), vol 2808, 2024. Springer Nature. pp. 177-195.
- 63. Verdes JM, et al. Calbindin D28k distribution in neurons and reactive gliosis in cerebellar cortex of natural Rabies virus–infected cattle. J Vet Diagn Invest. 2016; 28: 361-368.
- 64. Vigot R, et al. Increased calbindin-D28K immunoreactivity in rat cerebellar Purkinje cell with excitatory amino acids agonists is not dependent on protein synthesis. Arch Ital Biolo 2004; 142: 69-75.
- 65. von Rüden et al. Distemper virus encephalitis exerts detrimental effects on hippocampal neurogenesis. Neuropathol. Appl. Neurobiol 2012; 38: 426-442.
- 66. Wang K, et al. Central nervous system diseases related to pathological microglial phagocytosis. CNS Neurosci. Ther 2021; 27: 528-539.
- 67. Wilkes RP. Canine distemper virus in endangered species: Species jump, clinical variations, and vaccination. Pathogens 2023; 12: 57.
- 68. Wolf SA, et al. Microglia in physiology and disease. Annu Rev Physiol 2017; 79: 619-643.
- 69. Wünschmann A, et al. Parvovirus-induced encephalitis in a juvenile raccoon. J Vet Diagn Invest 2021; 33: 140-143.

- 70. Zhao J, et al. Pathogenesis of canine distemper virus in experimentally infected raccoon dogs, foxes, and minks. J Virol 2015; 35: 567-578.
- 71. Zurbriggen A, et al. Oligodendroglial pathology in canine distemper. Acta Neuropathol 1998; 95: 71-77.

## 9. **ANEXOS**

ANEXO I

## **HEMATOXILINA-EOSINA**

- Desparafinar
- 1- Xilol 20' en estufa
- <u>Hidratar</u>
- 2- Alcohol 100°, 1'
- 3- Alcohol 95°, 1'
- 4- Alcohol 70°, 1'
- 5- Lavado en agua corriente (varios pasajes, el último lavado se realiza con agua destilada)
- <u>Tinción</u>
- 6- Hematoxilina de Mayer 10'
- 7- Lavado con agua corriente 10'
- 8- Eosina 3-4'
- 9- Lavado rápido en agua
- <u>Deshidratar</u>
  10-Alcohol 95, 2'
- 11-Alcohol 100, 2' 12-Alcohol 100, 2'
- <u>Montaje</u>
- 13-Xilol 1, 2´ 14-Montaje

ANEXO II

## LUXOL FAST BLUE (KIT ab 150675)

1. Desparafinar e hidratar en agua destilada.

**2**. Incubar láminas en solución **LFB** 2 horas a 60°c (en Coplin tapado para evitar evaporación).

3. Enjuagar en agua destilada.

**4**. Diferenciar por inmersión en **Carbonato de Litio**, hasta 20". (Realizarlo en cajas de Petri con movimientos que ayuden a arrastrar la solución de LFB).

**5**. Continuar diferenciación en repetidas inmersiones (3) en alcohol 70º hasta que la sustancia gris quede incolora y la sustancia blanca quede azul.

6. Enjuagar en agua destilada.

**7**. Incubar en **Cresil Violeta** por 2-5' (se encuentra guardado en la heladera a 4°c, aplicarlo con gotero).

8. Lavar rápidamente en agua destilada.

9. Deshidratar rápidamente en 3 cambios de alcohol absoluto.

**10**. Aclarar y montar.

ANEXO III

## INMUNOQUISTOQUÍMICA

#### 1. Desparafinar:

- Xilol 20' en estufa

#### 2. Hidratar:

- Alcohol 100°, 2'
- Alcohol 95°, 2'
- Alcohol 70°, 2'
- Lavado en agua corriente 2'
- Enjuague con agua destilada 2'

## 3. Bloqueo de peroxidasas:

- Secado con papel absorbente
- Agregado de peroxidasa 3%, 5' (con gotero)
- Agua destilada 5'
- PBS (Tampón fosfato salino)

## 4. Pre-tratamiento:

- Vaporera 30' a 95°. Con Buffer Decloaker
- Temperatura ambiente, 20' (vaporera semi-tapada)
- Lavado en PBS 5'

## 5. Anticuerpo primario

- Secado con papel absorbente alrededor del tejido
- Colocar en cámara húmeda
- Aplicación de anticuerpo con la dosis deseada o con gotero en caso de ser Ready To Use (RTU). Dejar en cámara húmeda toda la noche a 4ºc.
- Control negativo con PBS

## A la mañana siguiente:

- Agua destilada 5'
- Lavar con PBS 5'
- Secado con papel absorbente

## 6. Anticuerpo secundario: Sistema de detección

- Para Anticuerpo de RATÓN:
- **Probe:** Incubar por 10' a temperatura ambiente. Después del tiempo de incubación volcar el excedente, pero no lavar.

- **Polymer:** Incubar por 10' a temperatura ambiente.
- Lavar con PBS 5'
- Agua destilada 5'
- Secado con papel absorbente alrededor del tejido
  - Para Anticuerpo de RATÓN específicamente diseñado para tejidos de caninos:
- **Mouse on Canine, HRP-Polymer**, Biocare medical, incubar 30' a temperatura ambiente
- Lavar con PBS 5'
- Agua destilada 5'
  Secado con papel absorbente alrededor del tejido
  - Para Anticuerpo de CONEJO:
- **Polymer:** Incubar por 30' a temperatura ambiente.
- Lavar con PBS 5'
- Agua destilada 5'

Secado con papel absorbente alrededor del tejido

- Para anticuerpo de CABRA:
- Rabbit Anti-Goat IgG H&L (HRP) 1/200 por 30' a temperatura ambiente.
- Lavar con PBS 5'
- Agua destilada 5'
- Secado con papel absorbente alrededor del tejido

## 7. Diaminobencidina (DAB):

- Agregado de 150µl por lámina aproximadamente de DAB (3-5')
- Agua corriente para cortar

## 8. Contra-tinción, deshidratación y montaje:

- Hematoxilina 4'
- Virado en agua corriente 10'
- Alcohol 95°, 2'
- Alcohol 100°, 2'
- Alcohol 100°, 2'
- Xilol 2'
- Xilol 2'
- Montaje

Nota: Todo lo que haya tenido contacto con la Diaminobencidina debe ser inactivado con hipoclorito de sodio.
#### ANEXO IV

Methods in Molecular Biology 2808

# **Springer Protocols**

Dzwokai Z. Ma Christian K. Pfaller *Editors* 

# Measles and Related Morbilliviruses

**Methods and Protocols** 

💥 Humana Press

## Chapter 14



#### Histopathological Analysis of Brains from Dogs Infected with Canine Distemper Virus

José Manuel Verdes (), Camila Larrañaga, Belén Varela, Victoria Iribarnegaray, Victoria Yozzi, Gimena Feijóo, and Kanji Yamasaki

#### Abstract

We describe the use of conventional histology and immunohistochemistry against canine distemper virus (CDV) to examine the brains of domestic dogs with a confirmed diagnosis of CDV infection. Histologically, to identify the main typical lesions, we used conventional H&E stain; to evaluate the progressive demyclination, we used Luxol Fast Blue stain; and to identify the presence of viral particles in these affected regions, we used immunohistochemistry against CDV. We confirm that the histopathological analysis of brains of distemper-infected dogs is a powerful tool to evaluate the typical brain lesions and could be used as an interesting natural model to continue studying the pathogenesis of canine distemper in different species and/or other morbillivirus infections, like measles.

Key words Animal model, Distemper, Dog, Histopathology, Measles, Comparative neuropathology

#### 1 Introduction

Canine distemper is one the most infectious diseases of domestic dogs. It is also known as a highly prevalent viral infectious disease of various non-canine hosts, including nonhuman primates [3, 8]. Recently, we performed a systematic study of neuropathological changes to clarify the histological hallmarks in vaccinated dogs infected with CDV [4]. The main changes observed in these cases were demyelination, gliosis, nonsuppurative meningitis, lymphocytic perivascular cuffing, and inclusion bodies in the cerebrum and cerebellum [4]. Based on histopathological changes, all lesions were classified as subacute or chronic. Lesions suspected as being acute were not observed [4]. Previous reports propose canine distemper virus infection as an animal model to study pathogenesis of multiple sclerosis [14] or measles in humans [2]. Here, we describe the use of conventional histology and immunohistochemistry against CDV to study neuropathological changes in dogs

Dzwokai Z. Ma and Christian K. Pfaller (eds.), Measles and Related Morbilliviruses: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology, vol. 2808, https://doi.org/10.1007/978-1-0716-3870-5\_14, © The Author(s), under exclusive license to Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2024

177





### Article Pathological Study of Demyelination with Cellular Reactions in the Cerebellum of Dogs Infected with Canine Distemper Virus

José Manuel Verdes <sup>1,\*</sup>, Camila Larrañaga <sup>1</sup>, Guillermo Godiño <sup>1</sup>, Belén Varela <sup>1</sup>, Victoria Yozzi <sup>1</sup>, Victoria Iribarnegaray <sup>2</sup>, Luis Delucchi <sup>3</sup> and Kanji Yamasaki <sup>1,4</sup>

- <sup>1</sup> Pathology Unit, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary, Universidad de la República (Udelar). Route 8 Km 18, Montevideo 13000, Uruguay; camilalarranaga@gmail.com (C.L.); guille030599@gmail.com (G.G.); belenvarela42@gmail.com (B.V.); victoriayozzi@gmail.com (V.Y.); yamasaki-kanji1914@outlook.jp (K.Y.)
- <sup>2</sup> Microbiology Unit, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary, Universidad de la República (Udelar), Montevideo 13000, Uruguay; victoria.iribarnegaray@pedeciba.edu.uy
- <sup>3</sup> Department of Clinics & Veterinary Hospital, Small Animals Medicine Unit, Clinical Neurology, Faculty of Veterinary, Universidad de la República (Udelar), Montevideo 13000, Uruguay; Idelucchi@fvet.edu.uy
- <sup>4</sup> Japan International Cooperation Agency (JICA), Br. Artigas 417 Of.601, Montevideo 11300, Uruguay
- \* Correspondence: jose.verdes@fvet.edu.uy; Tel.: +598-2-1903-2519

Abstract: The purpose of this study was to examine the relationship between demyelination and cellular reactions in the cerebellum of Canine Distemper Virus (CDV)-infected dogs. We subdivided the disease staging by adding the degree of demyelination determined by Luxol Fast Blue staining to the previously reported disease staging from the acute stage to the chronic stage, and investigated the relationship between demyelination in the cerebellum and the number and histological changes in astroglia, microglia, and Purkinje cells in each stage. Reactions of astrocytes and microglia were observed at an early stage when demyelination was not evident. Changes progressed with demyelination. Demyelination initially began in the medulla adjoining the fourth ventricle and gradually spread to the entire cerebellum, including the lobes. CDV immune-positive granules were seen from the early stage, and inclusion bodies also appeared at the same time. CDV immune-positive reaction and inclusion bodies were observed in astrocytes, microglia, neurons, ependymal cells, and even leptomeningeal mononuclear cells. On the other hand, infiltration of CDV-immunoreactive particles from the pia mater to the gray matter and further into the white matter through the granular layer was observed from an early stage. Purkinje cells decreased from the intermediate stage, and a decrease in cells in the granular layer was also observed. There was no clear association between age and each stage, and the stages did not progress with age.

Keywords: canine distemper; demyelination; glial cells; pathology; Purkinje cells

#### 1. Introduction

Canine distemper is an infectious disease caused by a Morbillivirus, belonging to the Paramyxoviridae family, which infects a broad range of terrestrial and aquatic carnivores [1]. It has been reported that demyelination is a characteristic change in the brains of dogs infected with Canine Distemper Virus (CDV), and it has been discussed that glial cells such as astrocytes, oligodendroglia, and microglia are related with demyelination [1–5]. Many studies have focused on changes in astrocytes during the early stages of CDV infection [6–8], and Kabakci et al. [9] reported that CDV infected both astrocytes and oligodendrocytes, and the gradual loss of oligodendrocytes was most likely responsible for the progressive demyelination. In addition, demyelination during CDV-demyelinating lesions was said to represent a biphasic process with a primary virus-induced oligodendroglial dystrophy followed by a secondary wave of immune-mediated myelin destruction [10,11]. Two possible routes for demyelination have been reported; one route is that CDV infects astrocytes,



**Citation:** Verdes, J.M.; Larrañaga, C.; Godiño, G.; Varela, B.; Yozzi, V.; Iribarnegaray, V.; Delucchi, L.; Yamasaki, K. Pathological Study of Demyelination with Cellular Reactions in the Cerebellum of Dogs Infected with Canine Distemper Virus. *Viruses* **2024**, *16*, 1719. https:// doi.org/10.3390/v16111719

Academic Editors: Monica G. Candela and Nieves Ortega Hernández

Received: 14 September 2024 Revised: 7 October 2024 Accepted: 14 October 2024 Published: 31 October 2024



**Copyright:** © 2024 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (https:// creativecommons.org/licenses/by/ 4.0/). which then infect oligodendroglia, and the other route is that CDV infects microglia through astrocytes and ultimately affects oligodendroglia [3]. It has been well known that CDV primarily affects the cerebellum [5,12,13]. On the other hand, studies using gene expression analysis of astrocytes after infection have also been reported recently, as astrocytes are the main cellular target of CDV and already undergo reactive changes in brain lesions before demyelination [2].

Histopathologically, cerebellar lesions have been classified based on Hematoxylin-Eosin (HE)-stained specimens, with the addition of immunohistochemistry, transcriptome, and various other methods [3,8,10,14–16]. On the other hand, it has been reported that CDV infection experiments on ferrets preferentially target neurons in general, and particularly Purkinje cells and granule cells [17]. The purpose of this research is to clarify the relationship between demyelination and glial cells, using the cerebellum of natural CDV-infected dogs, in which the presence of the virus was confirmed by immunohistochemistry against CDV, and positive Polimerase Chain Reaction (PCR) tests. Furthermore, we subdivided the stage classification by adding the degree of demyelination using Luxol Fast Blue (LFB) staining to the conventional classification from acute-to-chronic stage, and examined the relationship between demyelination and each glial cell in each stage. Finally, we investigated the Purkinje cell changes in each of these stages.

#### 2. Materials and Methods

#### 2.1. Dogs

Twenty-eight dogs naturally infected by CDV were used in this study. The ages ranged from 25 days to 10 years. There were 15 male and 13 female dogs, respectively. CDV-immunopositive granules were confirmed in several regions of the brains of the dead dogs through immunohistochemical testing, and infection in twenty-eight dogs was confirmed through PCR analysis. In addition, considering the age of CDV-infected dogs, five dogs ranging from 45 days old to 6 years old were selected as a control group. In the control group, infectious diseases were excluded as the cause of death, and immunohistochemical or PCR tests were negative.

In our previous study on natural CDV-infected dogs [18], we classified the stages of the histopathological lesions as acute, subacute, or chronic based on previous studies on natural and experimental infection in dogs [3,11,14–16,19,20]. Namely, acute lesions were characterized by focal vacuolation, gliosis, inclusion bodies, and CDV-immunopositive cells without demyelination, subacute lesions were characterized by demyelination, gliosis, necrosis, inclusion bodies, CDV-immunopositive cells, and perivascular mononuclear infiltration (cuffing) of two to three layers of thickness, and chronic lesions were similar to the subacute stage, but perivascular infiltration was more prominent, of at least three layers of thickness. In the present study, we subdivided subacute changes based on the degree of demyelination determined by LFB staining in order to clarify the relationship between demyelination and other changes. In the acute group, no demyelination was observed, in subacute 1 group, demyelination was less than 30% of the entire specimen, in subacute 2 group, demyelination was in 30 to 70%, and in subacute 3, demyelination was 70% or more. We classified the disease into acute, subacute 1, subacute 2, subacute 3, and chronic groups based on HE staining and LFB staining. As a result, the 28 dogs of CDV infection were subdivided into 4 acute cases, 4 subacute 1 cases, 9 subacute 2 cases, 5 subacute 3 cases, and 6 chronic cases.

#### 2.2. Histopathology and Immunohistochemistry

Routine autopsy was performed soon after death and selected tissues including the cerebellum were fixed in 10% buffered neutral formalin solution and routinely processed for histologic examination. Tissue sections were stained with Hematoxylin-Eosin (HE), as well as with LFB stains according to Verdes et al. [21].

For immunohistochemistry, a mouse anti-CDV monoclonal antibody (Biorad, MCA 1893, Hercules, CA, USA) was used, followed by a conjugated secondary antibody in

an HRP-polymer detection system (Mouse-on-canine HRP-polymer, Biocare Medical, Pacheco, CA, USA); positive antigen–antibody reactions were observed by incubation with 3.3-diaminobenzidine-tetrahidrochloride (DAB) as described previously [22]. Glia cells were immunostained using specific primary antibodies against intermediate filaments of astrocytes (GFAP) and microglia (Iba1). According to Verdes et al. [23], a primary antibody against the calcium binding protein Calbindin D 28k (CbD28k) was used as a marker to identify and count Purkinje cells. Details of the type and origin of primary antibodies, dilution used, and sources are summarized in Table 1.

Primary Antibody	Source	Dilution	Species/Type	<b>Detection System</b>
MCA 1893 Canine Distemper Virus	Biorad	1:250	Mouse/monoclonal	Mouse-on-canine HRP-Polymer
Glial Fibrillary Protein (GFAP)	Biocare Medical	edical RTU* Mouse/monoclonal		MACH 4 Universal HRP-Polymer
Anti-Iba1 (ab5076)	Abcam	1:1000	Goat/polyclonal	Rabbit Anti-Goat IgG H&L (HRP) ab6741
Calbindin (orb5912)	Biorbyt	1:200	Rabbit/polyclonal	MACH 4 Universal HRP-Polymer

Table 1. Summary of primary antibodies and detection systems used.

\* Ready to use.

In addition, four pathologists (JMV, CL, BV, KY) classified the stages of the histopathological lesions following as acute, subacute, or chronic based on the previous studies [3,10, 11,14–16,19,24]. Acute lesions were characterized by focal vacuolation, gliosis, inclusion bodies, and CDV-positive cells, subacute lesions were characterized by demyelination, gliosis, necrosis, perivascular mononuclear infiltration (cuffing) of two to three layers of thickness, inclusion bodies, and CDV-immunopositive cells, and chronic lesions were similar to the subacute stage, but perivascular infiltration was more prominent, of at least three layers of thickness.

Changes in the numbers of astrocytes, microglia, and Purkinje cells were examined based on the results of the above immunohistochemical staining. The area to be examined was the white matter adjacent to the fourth ventricle for astroglia and microglia, where the changes first appeared and where the changes were characteristic. Purkinje cells were evaluated in the cerebellar cortex, selecting the neighbor cerebellar folia to the same anatomical region studied to evaluate glial cells.

#### 2.3. Image Capture and Analysis

All histological slides were scanned with a slide scanner (Motic Easy Scan One<sup>®</sup>, Motic China Group Co., Ltd., Xiamen, China) for subsequent analysis, and the whole slide images were viewed and captured using the Motic DSAssistant<sup>®</sup> software (Motic VM V1 Viewer 2.0<sup>®</sup>, version 2019-08-02, China).

Astrocytes, microglia, and Purkinje cells were counted in canine cerebellar sections, based on the results of the specific immunohistochemistry against GFAP (astrocytes marker), Iba1 (microglia marker), and CbD28k (Purkinje cell marker).

The counting was done manually in images captured in  $400 \times$  fields for astrocytes and microglia. The examined region included the fourth ventricle region and the central white matter, capturing two images per animal, one for each area. For the counting of Purkinje cells, a whole image of a cerebellar folia per animal was used, in fields viewed at  $40 \times$ .

#### 2.4. Statistical Analysis

Statistical analysis was performed using GraphPad Prism<sup>®</sup> (version 10.1.1 -323- for Windows 64-bit, GraphPad Software, Boston, MA, USA, www.graphpad.com). One-way ANOVA tests followed by multiple comparisons using Tukey's test were used to assess the

difference between groups. Data are presented as means  $\pm$  standard deviation. The level of statistical significance used in all studies was  $p \le 0.05$ .

#### 3. Results

#### 3.1. Relationship Between Each Stage and Age or Sex

There was no relationship between the stage and the dog's age, and there was no tendency for the acute to be young and the chronic to be old. For example, an animal was died at 45 days of age in the chronic stage. There was also no relationship between each stage and sex. Many of the dogs were mixed breed, and there was no relationship between each stage and a specific breed. In the control group, the numbers of astrocytes, microglia, and Purkinje cells were not related to age, breed, sex, or body weight.

#### 3.2. Histopathological and Immunohistochemical Findings

A summary of histological findings is shown in Table 2.

**Table 2.** Histological findings in cerebellum in each stage, including a summary of number of studied dogs and average age in each group.

Groups	Number of Animals	Average Month Age (Range)	Histopathological Findings	
Control	5	(45 days old–6 years old)	No changes	
Acute	4	(25 days old–3 years old)	glial cell reaction, inclusion bodies, CDV-immunoreactive particles, meningitis	
Subacute 1	4	(30 days old–3 years old)	demyelination, glial cell reaction, inclusion bodies, CDV-immunoreactive particles, meningitis	
Subacute 2	9	(2 months old–10 years old)	demyelination, glial cell reaction, inclusion bodies, CDV-immunoreactive particles, meningitis, mild decreased granular layer cells, and Purkinje cells	
Subacute 3	5	(3 months old–3 years old)	demyelination, glial cell reaction, inclusion bodies, CDV-immunoreactive particles, meningitis, moderate decreased granular layer cells, and Purkinje cells	
Chronic	6	(3 months old–3 years old)	demyelination, gliosis, glial cell reaction, inclusion bodies, CDV-immunoreactive particles, meningitis, severe decreased granular layer cells, and Purkinje cells	

A summary of the immunohistochemical study is shown in Table 3; the graphical representation of the total number of GFAP-immunoreactive astrocytes in each stage, with statistically significant differences observed between the control and chronic group of p = 0.0002 (Figure 1a), and the representative immunohistochemistry against GFAP in the cerebellum of a normal dog (Figure 1b) and the cerebellum of a dog in the chronic stage (Figure 1c) is shown. In Figure 2, the graphical representation of the total number of Iba1-immunoreactive microglia in each stage, without statistically significant differences between the groups (Figure 2a), and the representative immunohistochemistry against Iba1 in the cerebellum of a dog of subacute group 2 (Figure 1b,c) are shown. Figure 3a shows the graphical representation of the total number of CbD28k-immunoreactive Purkinje cells in each stage, with statistically significant differences observed between the control and subacute group 2 (p = 0.0144), control and subacute 3 (p = 0.0024), and between the control and chronic groups (p = 0.0163). The representative immunohistochemistry against CbD28k-immunoreactive Purkinje cells in the cerebellum of a normal dog (Figure 3b) and the cerebellum of a CDV-infected dog from subacute 3 stage (Figure 3c) is shown.



**Figure 1.** (a) Comparative number of astrocytes with positive immunostaining against GFAP in the fourth ventricle and central white matter region between the control, acute, subacute 1, subacute 2, subacute 3, and chronic animal groups. Statistically significant differences were observed between the control and chronic group of p = 0.0002. (b) Representative GFAP-immunohistochemistry of cerebellar white matter of a normal dog (control group). Immunolabeling for GFAP is observed in normal astrocytes. Scale = 50 µm. See details in the upper right inset of the figure. (c) Representative GFAP-immunohistochemistry of cerebellar white matter of a CDV-infected dog (chronic group). Immunostaining for GFAP is observed in reactive astrocytes, showing an increase in cytoplasmic volume in gemistocytic astrocytes. Scale = 50 µm. See details in the upper right inset of the figure.



**Figure 2.** (a) Comparative number of microglia with positive immunostaining against Iba1 in the region of the fourth ventricle and the central white matter between the control, acute, subacute 1, subacute 2, subacute 3, and chronic animal groups. No significant differences were found. (b) Representative Iba1-immunohistochemistry of cerebellar white matter of a CDV-infected dog from subacute group 2. Immunostaining against Iba1 is observed in the periventricular region, and the microglia have an amoeboid shape. Scale = 60  $\mu$ m. See details in the upper right inset of the figure. (c) Representative Iba1-immunohistochemistry of cerebellar white matter of a CDV-infected dog (chronic group). Same animal and region of (b). Intense immunostaining against Iba1 is observed in the cerebellar white matter. Scale = 60  $\mu$ m. See details in the upper right inset of the figure.



**Figure 3.** (a) Comparative number of Purkinje cells with positive immunostaining against CbD28k in the cerebellar cortex between the control, acute, subacute 1, subacute 2, subacute 3, and chronic animal groups. Statistically significant differences were observed between the control and subacute group 2 (p = 0.0144), control and subacute 3 (p = 0.0024), and between the control and chronic groups (p = 0.0163). (b) Representative Calbindin (CbD28k)-immunohistochemistry of cerebellar cortex of a normal dog (control group). Positive immunostaining against CbD28k is observed in all the Purkinje cells (in the soma, axonal process, and dendritic arborization). Scale = 100 µm. See details in the upper right inset of the figure. (c) Representative CbD28k-immunohistochemistry of cerebellar cortex of a CDV-infected dog from subacute group 3. Positive immunostaining against CbD28k is observed in all Purkinje cells, showing a reduction in the number of immunoreactive Purkinje cells. Scale = 100 µm. See details in the upper right inset of the figure.

Groups	Number of Animals	Average Month Age	Numbers		
		(Range)	Astrocytes	Microglia	Purkinje Cells
Control	5	(45 days old–6 years old)	$35\pm11~^{\rm a}$	$64\pm19$	$49\pm6~^{a}$
Acute	4	(25 days old–3 years old)	$41\pm12$	$64\pm13$	$42\pm17$
Subacute 1	4	(30 days old–3 years old)	$42\pm13$	$56\pm16$	$25\pm 6$
Subacute 2	9	(2 months old–10 years old)	$36\pm13$	$75\pm26$	$24\pm14^{\ b}$
Subacute 3	5	(3 months old–3 years old)	$32\pm12$	$63\pm26$	$15\pm12~^{ m c}$
Chronic	6	(3 months old–3 years old)	$63\pm22^{\text{ b}}$	$44\pm17$	$23\pm13$ <sup>d</sup>

**Table 3.** Numbers of each cell type in cerebellum in each stage. Values (mean  $\pm$  standard deviation) marked with different letters within the same column are significantly different (*p* < 0.05).

LFB staining at each stage is shown in Figure 4a–f, demyelinating changes in white matter are shown in Figure 5, and CDV-immunoreactive particle deposition is shown in Figure 6a–d.



**Figure 4.** (a) Demyelination is not detected. No. 397. Control group. LFB. Scale =  $60 \mu m$ . See the asterisk. (b) Demyelination is not apparent. No. 010. Acute group. LFB. Scale =  $60 \mu m$ . See the asterisk. (c) Slight demyelination is observed. No. 366. Subacute 1 group. LFB. Scale =  $60 \mu m$ . See the asterisk. (d) Demyelination is apparent. No. 463. Subacute 2 group. LFB. Scale =  $100 \mu m$ . See the asterisk. (e) Demyelination is progressed. No. 23. Subacute 3 group. LFB. Scale =  $100 \mu m$ . See the asterisk. (f) Demyelination is severe. No. 11. Chronic group. LFB. Scale =  $100 \mu m$ . See the asterisk.



**Figure 5.** Demyelination is apparent around blood vessel (asterisk) showing cuffing (black arrow). Dog No. 11. Chronic group. LFB. Scale =  $90 \mu m$ .



**Figure 6.** (a) Canine distemper virus (CDV)-immunopositive particles are detected in the subventricular parenchyma (asterisk). Immunohistochemical staining for CDV. No. 53. Acute group. Scale =  $60 \ \mu m$ . (b) Canine distemper virus (CDV)-positive particles are observed mainly in astrocytic podocytes around blood vessel arrowhead. Vascular endothelial cells and intravascular mononuclear cells also show CDV-immunopositivity. Immunohistochemical staining for CDV. No. 53. Acute group. Scale =  $30 \ \mu m$ . (c) Many canine distemper virus (CDV)-immunopositive particles are observed in glial cells around blood vessels. No. 249. Subacute 3 group. Scale =  $100 \ \mu m$ . (d) Many canine distemper virus (CDV)-immunopositive particles are observed in glial cells around blood vessels. No. 249. Subacute 3 group. Scale =  $100 \ \mu m$ . (d) Many canine distemper virus (CDV)-immunopositive particles are observed in the three layers (molecular, Purkinje cells, and granular) of gray matter and white matter (see asterisk in molecular layer). Immunohistochemical staining for CDV. No. 6. Subacute 3 group. Scale =  $300 \ \mu m$ .

Histologically, the main lesions were demyelination, glial cell reaction, reduced number of Purkinje cells, and meningitis.

In the acute group, all animals subjected to PCR testing were positive. No demyelination and vacuoles were observed by HE and LFB staining. CDV particles were detected in astrocytes, microglia, neurons, pia mater, and the choroid plexus. In addition, CDVimmunoreactive particles were observed in the white matter adjacent to the fourth ventricle in all cases, and were also observed in endothelial cells of blood vessels, mononuclear cells inside and outside blood vessels in the white matter away from the fourth ventricle, the white matter of cerebellar lobes, and the granular layer. Nuclear and cytoplasmic inclusions were observed mainly in astrocytes, microglia, and pia mater. Although there was no significant increase in the number of astrocytes and microglia compared to those in the control group, they were enlarged compared to cells in the control group. CDV-immunoreactive granules were observed in these enlarged cells.

In subacute 1 group, changes were similar to those in the acute stage, but demyelination was apparent by LFB staining. Changes were occurring in the white matter adjacent to the fourth ventricle. In one case, CDV-immunoreactive granules infiltrated from the pia mater into the gray matter, and were also observed in Purkinje cells, and in cells of the granular layer. Although there was no significant increase in the number of astrocytes and microglia compared to the acute group, many enlarged cells were observed.

In subacute 2 group, demyelination occurred frequently in areas other than the white matter adjacent to the fourth ventricle, and demyelination in the white matter of the cerebellar folia was observed in more than half of the cases. Demyelination and associated changes in astrocytes and microglia progressed around blood vessels, such that areas of demyelination were scattered throughout the white matter. Although there was no significant increase in astrocytes and microglia compared to the acute and subacute 1 groups, gemistocytic astrocytes, multinuclear astrocytes, fibrillary gliosis, and rod cells were observed. Foamy cells also appeared in areas where changes were progressing. LFB staining revealed swelling, collapse, and disappearance of the myelin sheath around the myelinated axons. CDV-immunoreactive particles and inclusion bodies were increased compared to the subacute 1 group.

In the subacute 3 group, the changes in the subacute 2 group progressed, and the area of demyelination increased and spread throughout the white matter. Although no significant increase in the number of astrocytes was observed, many gemistocytic astrocytes and multinuclear astrocytes were observed (Figure 7). In addition, CDV particles in inclusion bodies were increased. Although lymphocytes, plasma cells, monocytes, and macrophages were aggregated around blood vessels, the number of these cells was 1 to 2 layers.

In the chronic group, changes such as severe demyelination, a significant increase in the number and enlargement of astrocytes and microglia, an increase in CDV-immunoreactive particles, and an increase in inclusion bodies were progressing. The perivascular cuffing showed three or more layers.

Meningitis was observed in one subacute 1, three subacute 2, three subacute 3, and three chronic cases. Mononuclear cells with CDV-immunoreactive particles were detected in and around blood vessels.

As described, astrocytes and microglia did not increase in number compared to the control group, but were enlarged in the acute group. Furthermore, gemistocytic astrocytes, multinuclear astrocytes, fibrillary gliosis, and rod cells were observed in the subacute groups. Demyelination was observed in the white matter of the cerebellar folia depending on the stages, and CDV infiltration from the pia mater into the gray matter was also observed. According to these changes, a decrease in Purkinje cells and necrotic changes in the granular layer were detected (Figure 8).



**Figure 7.** Marked increase in the number of astrocytes and microglia is detected in the white matter showing demyelination. Astrocytes are enlarged, recognized as gemistocytes (asterisk), and multinucleated cells are also seen. Nuclear inclusion bodies are observed (black arrow). Dog No. 436. Subacute 2 group. HE. Scale =  $30 \mu m$ .



**Figure 8.** The white matter stains on some cerebellar folia have disappeared (asterisk). The number of cells in the granular layer decreases with decreasing number of Purkinje cells. No. 15. Chronic group. HE. Scale =  $100 \mu m$ .

#### 4. Discussion

Our results showed that in the cerebellum, demyelination, reactions of astrocytes, oligodendroglia, and microglia, the appearance of inclusion bodies, a reduction in the number of Purkinje cells, and degeneration of the granular layer were observed. Demyelination was evident with LFB staining, and was observed as a decrease in staining with HE staining in the subacute 1 group. Demyelination was consistent with vacuolization in the subacute 2 group and later. Astrocytes and microglia were hypertrophic even in the acute stage, when no demyelination was observed, and progressed with the stage. It has been reported that in demyelinating distemper lesions, the majority (95%) of infected cells have been identified as astrocytes, representing the main target for CDV [25,26]. In

this study, CDV-immunoreactive granules were observed not only in astrocytes but also in microglia at the early stage of infection. Furthermore, it has been said that astrocytes and microglia responded during the early stages of infection, and there are also reports that their numbers increased [2,3,20]. In this study, there was no significant increase in the number of astrocytes and microglia between the control group and each infection group, but these cells changed morphologically from an early stage, and CDV-immunoreactive granules were also observed in these cells. It is clear that normal function is impaired. The fact that morphological changes, rather than increases in the number of astrocytes and microglia, were a characteristic feature is considered to be important information obtained in this study. Various functions of astrocytes have been reported, among which the key function of astrocytes is said to be the removal of neurotransmitters, such as glutamate, from the synaptic cleft by specific transporters and subsequent degradation by glutamine synthetase (glutamate-glutamine cycle), thus preventing excitotoxic cell death of neurons and myelin-producing oligodendrocytes [16,27]. In this study, astrocyte responses were observed before demyelination, so it is apparent that astrocytes are involved in myelin changes from the early stage of infection.

Cytoplasmic and intranuclear inclusion bodies could be frequently found in acute and subacute lesions [28]. In the present study, CDV granules and inclusion bodies were observed from the acute stage, before the onset of demyelination, and progressed with the stage. It has been reported that viral antigens may disappear from the inflammatory demyelinating lesions due to the antiviral immune responses in chronic CDV encephalomyelitis [29,30]. However, the responses of astrocytes and microglial cells, the increase in the number of CDV-immunoreactive particles within these cells, and the appearance of inclusion bodies did not decrease until the chronic stage in this study. Therefore, it was clear that changes in astrocytes and microglial cells appeared at an early stage and progressed with the stage. Two possible routes for demyelination have been reported; one route is that CDV infects astrocytes, which then infect oligodendroglia, and the other route is that CDV infects microglia through astrocytes and ultimately affects oligodendroglia [3]. Our results do not support either of these possibilities.

Changes were initially observed in the periventricular region and gradually became perivascular in the white matter. The periventricular region is said to be the first area that the virus infects. The main route of neural entry is via infected mononuclear cells that cross the blood–brain barrier, resulting in local viral release and subsequent infection of resident epithelial and endothelial cells. It has also been reported that the virus can spread through the brain once it enters the brain. It infects the cerebrospinal fluid (CSF), infects the ependymal lining cells of the ventricles, and ultimately infects glial cells and neurons [19,31–34]. On the other hand, demyelination, astrocyte and microglial reactions, and myelin degeneration were also observed in the white matter of cerebellar folia in the subacute 2 group. Furthermore, in the subacute 1 group, infiltration of CDV-immunoreactive granules from the leptomeninges into the gray matter was observed. In these cases, an astrocytic response was also observed in the gray matter, and cell loss in the granular layer was also observed. In cerebellar folia, CDV-immunoreactive particles were found in astrocytes, Golgi cells, and Purkinje cells. CDV-immunoreactive granules have been reported to extend from pial cells to the subpial gray matter [5,13,28,34,35]. We confirmed CDV infection from the leptomeninges to the gray and white matter described in our previous report [18].

In this study, we observed changes to Purkinje cells. The number of Purkinje cells decreased more significantly than in the subacute 2 group and gradually progressed. This fact was thought to be due not only to the influence of CDV infection in the white matter adjacent to the gray matter, but also to CDV infection from the leptomeninges to the gray and white matter. Effects on Purkinje cells have been reported in viral infections in various species of animals [7,36]. Focal vacuolation and a spongy appearance near the Purkinje cell layer in the cerebellum have also been observed in dogs with CDV infection [4], and Rudd et al. [17] also stated that Purkinje cells and granule cells are specifically targeted by CDV infection. In addition, changes in Purkinje cells and granular layers have been reported in

CDV infection in other animal species [37], and the changes in Purkinje cells and granule cells have been observed in the CDV infection experimental study in ferrets [17]. Based on the above reports and the present results, changes in Purkinje cells and the granular layer can be said to be one of the characteristics of CDV infection.

Age and each stage of disease have been discussed based on the dog's immune status. Young or immunocompromised dogs are said to show acute lesions, while mature dogs usually develop the chronic encephalomyelitis [1,11,20,38]. This study did not measure antibodies in the blood. Furthermore, there may be an issue with the strain of the CDV virus. In this study, the samples in the acute group ranged from 25 days after birth to 3 years old, and the onset at age 10 was identified in the subacute 2 group, instead of in the chronic group. These facts suggest that the stage of the lesions is related to the immune status due to various factors, and it seems unlikely that age alone is a factor associated with each stage.

#### 5. Conclusions

Astrocyte and microglial responses were observed at an early stage when demyelination was not evident. CDV-immunoreactive granules and inclusion bodies were also observed in various cells from the acute stage. A decrease in Purkinje cells and degenerative changes in the granular layer were also observed with demyelination. These changes were progressing along with the stage. There was no clear relationship between age and stage.

**Author Contributions:** Conceptualization, J.M.V., C.L., G.G., and K.Y.; methodology, J.M.V., C.L., G.G., B.V., VI., V.Y., L.D., and K.Y.; software, C.L. and G.G.; validation, J.M.V., C.L., G.G., B.V., and K.Y.; formal analysis, C.L., G.G., J.M.V., and K.Y.; investigation, C.L., G.G., J.M.V., and K.Y.; resources, J.M.V. and L.D.; data curation, J.M.V., C.L., G.G., B.V., VI., V.Y., L.D., and K.Y.; writing—original draft preparation, C.L., J.M.V., and K.Y.; writing—review and editing, C.L., J.M.V., and K.Y.; visualization, J.M.V., C.L., G.G., B.V., and K.Y.; project administration, J.M.V. and L.D.; funding acquisition, J.M.V. and L.D. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research was funded by the National Agency of Research and Innovation (ANII, Fondo María Viñas 2019), Grant FMV-1-2019-1-155934. C.L. was an MSc fellowship recipient of the National Agency of Research and Innovation (ANII). V.I. was a PhD fellowship recipient of Udelar's Postgraduate Academic Commission (Comisión Académica de Posgrados, CAP-Udelar). J.M.V. is a Research Career Member of the National Research System (SNI-ANII), Uruguay, and the Program for the Development of Basic Sciences (PEDECIBA), Uruguay.

**Institutional Review Board Statement:** The animal study protocol was approved by the Institutional Review Board of Veterinary Faculty's Animal Use Ethics Committee (Comisión de Ética en el Uso de Animales de la Facultad de Veterinaria, CEUA-FVET, Udelar, Montevideo, Uruguay), protocol code: CEUA FVET-Udelar N° 320/16. Date of approval: 10 October 2016.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Data are contained within the article.

Acknowledgments: The authors would like to thank all the owners that agreed to donate their dogs to participate in this study.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest.

#### References

- Carvalho, O.V.; Botelho, C.V.; Ferreira, C.G.T.; Scherer, P.O.; Soares-Martins, J.A.P.; Almeida, M.R.; Júnior, A.S. Immunopathogenic and neurological mechanisms of canine distemper virus. *Adv. Virol.* 2012, 2012, 163860. [CrossRef] [PubMed]
- Klemens, J.; Ciurkiewicz, M.; Chludzinski, E.; Iseringhausen, M.; Klotz, D.; Pfankuche, V.M.; Ulrich, R.; Herder, V.; Puff, C.; Baumgärtner, W.; et al. Neurotoxic potential of reactive astrocytes in canine distemper demyelinating leukoencephalitis. *Sci. Rep.* 2019, 9, 11689. [CrossRef] [PubMed]
- Lempp, C.; Spitzbarth, I.; Puff, C.; Cana, A.; Kegler, K.; Techangamsuwan, S.; Baumgärtner, W.; Seehusen, F. New Aspects of the Pathogenesis of canine distemper leukoencephalitis. *Viruses* 2014, *6*, 2571–2601. [CrossRef]

- 4. Pan, Y.; Liu, X.Y.; Meng, L.P.; Zhu, G.R.; Xia, Y.K.; Chen, J.S.; Yoshikawa, T. Pathogenesis of demyelinating encephalopathy in dogs with spontaneous acute canine distemper. *J. Integr. Agric.* **2013**, *12*, 334–343. [CrossRef]
- Vandevelde, M.; Zurbriggen, A. Demyelination in canine distemper virus infection: A review. Acta Neuropathol. 2005, 109, 56–68. [CrossRef]
- De Nardo, T.F.S.; Bertolo, P.H.L.; Bernardes, P.A.; Munari, D.P.; Machado, G.F.; Jardim, L.S.; Moreira, P.R.R.; Rosolem, M.C.; Vasconcelos, R.O. Contribution of astrocytes and macrophage migration inhibitory factor to immune-mediated canine encephalitis caused by the distemper virus. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2020, 221, 110010. [CrossRef] [PubMed]
- Zurbriggen, A.; Schmid, I.; Graber, H.U.; Vandevelde, M. Oligodendroglial pathology in canine distemper. *Acta Neuropathol.* 1998, 95, 71–77. [CrossRef]
- 8. Silva, M.C.; Fighera, R.A.; Mazzanti, A. Neuropatologia da cinomose canina: 70 casos (2005–2008). *Pesqui. Vet. Bras.* 2009, 29, 643–652. [CrossRef]
- 9. Kabakci, N.; Yarim, M.; Karahan, S.; Guvenc, T.; Yagci, B.B.; Gurcan, I.S. Immunohistochemical investigation of cerebellum in dogs infected with canine distemper virus. *Acta Vet. Hung.* **2004**, *52*, 327–337. [CrossRef]
- 10. Ulrich, R.; Puff, C.; Wewetzer, K.; Kalkuhl, A.; Deschl, U.; Baumgärtner, W. Transcriptional changes in canine distemper virus-induced demyelinating leukoencephalitis favor a biphasic mode of demyelination. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e95917. [CrossRef]
- 11. Vandevelde, M.; Fankhauser, R.; Kristensen, F.; Kristensen, B. Immunoglobulins in demyelinating lesions in canine distemper encephalitis. An immunohistological study. *Acta Neuropathol.* **1981**, *54*, 31–41. [CrossRef] [PubMed]
- 12. Bathen-Noethen, A.; Stein, V.M.; Puff, C.; Baumgärtner, W.; Tipold, A. Magnetic resonance imaging findings in acute canine distemper virus infection. *J. Small Anim. Pract.* 2008, 49, 460–467. [CrossRef]
- 13. Beineke, A.; Puff, C.; Seehusen, F.; Baumgärtner, W. Pathogenesis and immunopathology of systemic and nervous canine distemper. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **2009**, *127*, 1–18. [CrossRef] [PubMed]
- 14. Alldinger, S.; Fonfara, S.; Kremmer, E.; Baumgärtner, W. Up-regulation of the hyaluronate receptor CD44 in canine distemper demyelinated plaques. *Acta Neuropathol.* 2000, *99*, 138–146. [CrossRef]
- 15. Gröters, S.; Alldinger, S.; Baumgärtner, W. Up-regulation of mRNA for matrix metalloproteinases-9 and -14 in advanced lesions of demyelinating canine distemper leukoencephalitis. *Acta Neuropathol.* **2005**, *110*, 369–382. [CrossRef] [PubMed]
- 16. Spitzbarth, I.; Lempp, C.; Kegler, K.; Ulrich, R.; Kalkuhl, A.; Deschl, U.; Baumgärtner, W.; Seehusen, F. Immunohistochemical and transcriptome analyses indicate complex breakdown of axonal transport mechanisms in canine distemper leukoencephalitis. *Brain Behav.* **2016**, *3*, e00472. [CrossRef]
- 17. Rudd, P.A.; Bastien-Hamel, L.E.; von Messling, V. Acute canine distemper encephalitis is associated with rapid neuronal loss and local immune activation. *J. Gen. Virol.* 2010, *91*, 980–989. [CrossRef]
- 18. Feijoó, G.; Yamasaki, K.; Delucchi, L.; Verdes, J.M. Central nervous system lesions caused by canine distemper virus in 4 vaccinated dogs. *J. Vet. Diagn. Investig.* **2021**, *33*, 640–647. [CrossRef]
- Summers, B.A.; Greisen, H.A.; Appel, M.J. Early events in canine distemper demyelinating encephalomyelitis. *Acta Neuropathol.* 1979, 46, 1–10. [CrossRef]
- 20. Thomas, W.B.; Sorjonen, D.C.; Steiss, J.E. A retrospective evaluation of 38 cases of canine distemper encephalomyelitis. *J. Am. Anim. Hosp. Associ.* **1993**, *29*, 129–133.
- Verdes, J.M.; Larrañaga, C.; Varela, B.; Iribarnegaray, V.; Yozzi, V.; Feijóo, G.; Yamasaki, K. Histopathological analysis of brains from dogs infected with canine distemper virus. In *Measles and Related Morbilliviruses: Methods and Protocols*; Ma, D.Z., Pfaller, C.K., Eds.; Springer Nature: New York, NY, USA, 2024; Volume 2808, Chapter 14; pp. 177–195.
- 22. Fairley, R.A.; Knesl, O.; Pesavento, P.A.; Elias, B.C. Post-vaccinal distemper encephalitis in two Border Collie cross littermates. *N. Z. Vet. J.* **2015**, *63*, 117–120. [CrossRef] [PubMed]
- Verdes, J.M.; de Sant'Ana, F.J.F.; Sabalsagaray, M.J.; Okada, K.; Calliari, A.; Moraña, J.A.; de Barros, C.S.L. Calbindin D28k distribution in neurons and reactive gliosis in cerebellar cortex of natural rabies virus-infected cattle. *J. Vet. Diagn. Investig.* 2016, 28, 361–368. [CrossRef] [PubMed]
- 24. Seehusen, F.; Orlando, E.A.; Wewetzer, K.; Baumgärtner, W. Vimentin-positive astrocytes in canine distemper: A target for canine distemper virus especially in chronic demyelinating lesions? *Acta Neuropathol.* 2007, *114*, 597–608. [CrossRef] [PubMed]
- 25. Mutinelli, F.; Vandevelde, M.; Griot, C.; Richard, A. Astrocytic infection in canine distemper virus-induced demyelination. *Acta Neuropathol.* **1989**, 77, 333–335. [CrossRef]
- Summers, B.A.; Appel, M.J. Demyelination in canine distemper encephalomyelitis: An ultrastructural analysis. *J. Neurocytol.* 1987, 16, 871–881. [CrossRef]
- 27. Correale, J.; Farez, M.F. The Role of Astrocytes in multiple sclerosis progression. Front. Neurol. 2015, 6, 180. [CrossRef]
- 28. Baumgärtner, W.; Orvell, C.; Reinacher, M. Naturally occurring canine distemper virus encephalitis: Distribution and expression of viral polypeptides in nervous tissues. *Acta Neuropathol.* **1989**, *78*, 504–512. [CrossRef]
- 29. Koutinas, A.F.; Polizopoulou, Z.S.; Baumgaertner, W.; Lekkas, S.; Kontos, V. Relation of clinical sings to pathological changes in 19 cases of canine distemper encephalomyelitis. *J. Comp. Pathol.* **2002**, *126*, 47–56. [CrossRef]
- 30. Muller, C.F.; Fatzer, R.S.; Beck, K.; Vandevelde, M.; Zurbriggen, A. Studies on canine distemper virus persistence in the central nervous system. *Acta Neuropathol.* **1995**, *89*, 438–445. [CrossRef] [PubMed]
- 31. Axthelm, M.K.; Krakowka, S. Canine distemper virus: The early blood-brain barrier lesion. *Acta Neuropathol.* **1987**, *75*, 27–33. [CrossRef]

- 32. Frisk, A.L.; König, M.; Moritz, A.; Baumgärtner, W. Detection of canine distemper virus nucleoprotein RNA by reverse transcription-PCR using serum, whole blood, and cerebrospinal fluid from dogs with distemper. *J. Clin. Microbiol.* **1999**, 37, 3634–3643. [CrossRef] [PubMed]
- Higgins, R.J.; Krakowka, S.G.; Metzler, A.E.; Koestner, A. Primary demyelination in experimental canine distemper virus induced encephalomyelitis in gnotobiotic dogs. Sequential immunologic and morphologic findings. *Acta Neuropathol.* 1982, 58, 1–8. [CrossRef] [PubMed]
- 34. Rudd, P.A.; Cattaneo, R.; von Messling, V. Canine distemper virus uses both the anterograde and the hematogenous pathway for neuroinvasion. *J. Virol.* **2006**, *80*, 9361–9370. [CrossRef] [PubMed]
- 35. Summers, B.A.; Greisen, H.A.; Appel, M.J. Canine distemper encephalomyelitis: Variation with virus strain. *J. Comp. Pathol.* **1984**, 94, 65–75. [CrossRef]
- 36. Wünschmann, A.; Lopez-Astacio, R.; Armién, A.G.; Reed, L.; Parrish, C.R. Parvovirus-induced encephalitis in a juvenile raccoon. *J. Vet. Diagn. Investig.* **2021**, *33*, 140–143. [CrossRef]
- 37. Potgieter, L.N.; Patton, C.S. Multifocal cerebellar cortical necrosis caused by canine distemper virus infection in a raccoon. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **1984**, *185*, 1397–1399.
- 38. Vandevelde, M.; Zurbriggen, A. The neurobiology of canine distemper virus infection. Vet. Microbiol. 1995, 44, 271–280. [CrossRef]

**Disclaimer/Publisher's Note:** The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.