



Facultad de Ciencias Veterinarias
Universidad Nacional del Litoral

Maestría en Ciencias Veterinarias
Mención: Salud Animal

**DISTEMPER CANINO: EVALUACIÓN DE DOS ALTERNATIVAS
TERAPÉUTICAS Y CARACTERIZACIÓN DE ASPECTOS
CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICOS EN LA CIUDAD DE SANTA FE,
DURANTE LOS AÑOS 1998 - 2009.**

Autor:

Med. Vet. Mario Andrés Pinotti

Tesis para optar al grado de Magister en Ciencias Veterinarias

Esperanza, noviembre de 2011



Facultad de Ciencias Veterinarias
Universidad Nacional del Litoral

Maestría en Ciencias Veterinarias

Mención: Salud Animal

**DISTEMPER CANINO: EVALUACIÓN DE DOS ALTERNATIVAS
TERAPÉUTICAS Y CARACTERIZACIÓN DE ASPECTOS
CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICOS EN LA CIUDAD DE SANTA FE,
DURANTE LOS AÑOS 1998 - 2009.**

AUTOR: Med. Vet. Mario Andrés Pinotti

DIRECTOR: Dr. Enrique Antonio Formentini

CO-DIRECTOR: Dr. Eduardo Jesús Picco

MIEMBROS DEL TRIBUNAL DE TESIS: MSc. Nelsa Inés Widenhorn

MSc. Eduardo Vicente Moras

MSc. Roque Juan Gastaldi

Tesis para optar al grado de Magister en Ciencias Veterinarias

Esperanza, noviembre de 2011

A mi esposa Olguita

A mis hijos: María Sofía, Mario Leandro y Regina Elisa

A mi nuera Marina Battilana y a mi yerno José Fernández

A mis nietos: Martina Guadalupe, Juan Bautista, Julieta y Nina Franca

Agradecimientos

Esta tesis es el resultado de un esfuerzo de años, en una temática que me cautivó durante su desarrollo. Para poder llevarla a cabo recibí valiosos aportes institucionales, a los que debe sumarse la inestimable colaboración de muchas personas. A todos corresponde mi gratitud.

En primer término a la Universidad Nacional del Litoral, que como entidad madre, fue el vehículo que me permitió obtener subsidios indispensables para solventar los costos de buena parte de las determinaciones que debieron realizarse.

En segundo lugar, mi reconocimiento a la Facultad de Ciencias Veterinarias, ámbito de mi formación permanente, que además me proporcionó la infraestructura necesaria para arribar a los resultados buscados.

Una mención especial merece el Dr. Enrique Formentini, cabal director, que contribuyó a ensanchar mis horizontes de análisis, aportó una mirada que permitió extraer conclusiones amplias, y por su papel vital en el procesamiento de los datos.

Del codirector, Dr. Eduardo Picco agradezco sus valiosas indicaciones y aportes en momentos en que, con mucho elaborado, todo parecía estancarse.

También quisiera mencionar a mis compañeros del Laboratorio de Virología de la Facultad, en especial a la profesora Adela Gollán, que con su competencia en el manejo de cultivos celulares, llevó a buen término los intentos de aislamientos del virus del distemper canino y su correspondiente identificación, lo que nos permitió disponer de cepas regionales cuya utilización excederá los resultados que aquí se presentan.

A la Dra Nelsa Widenhorn, por facilitar las instalaciones, equipamiento, casuística y docentes del Hospital de Salud Animal para las tareas de diagnóstico y relevamiento de los pacientes que formaron parte de la última etapa del trabajo.

Finalmente, quisiera mencionar al Dr. Héctor Tarabla, docente en la Maestría, por su insistencia para que comience la redacción del texto de la tesis, argumentando que la

parte experimental ya la tenía realizada. Su prédica fue de capital importancia, pues me encontraba analizando la posibilidad de desagregar los resultados y emplearlos en publicaciones de alcance menor.

Y a todos aquellos que de un modo u otro prestaron su colaboración, tanto para la toma de muestras, diagnóstico y seguimiento de casos, registro de datos y tareas administrativas, que sería muy extenso nombrar, con el riesgo de alguna omisión.

3.5. Estudio epidemiológico	46
3.6. Estudio de eficacia terapéutica	46
3.6.1. Tamaño de la muestra, grupos experimentales y tratamiento	46
3.6.2. Parámetros para evaluar la eficacia terapéutica	46
3.6.3. Control de la evolución clínica de los animales.....	46
3.7. Estudio estadístico	47
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	49
4.1. Frecuencia de signos clínicos de distemper canino	49
4.2. Frecuencia de presentación clínica según: año, mes y estación climática	51
4.2.1. Frecuencia de presentación según año	51
4.2.2. Frecuencia de presentación según mes	52
4.2.3. Frecuencia de presentación según estación climática	55
4.3. Frecuencia de presentación clínica mensual y su relación con la temperatura y la humedad relativa ambiente.....	56
4.4. Evolución clínica según la estación climática	62
4.5. Frecuencia de presentación según sexo, tamaño y edad	63
4.6. Respuesta al tratamiento de distemper adicionando lipopolisacáridos bacterianos o azatioprina a la terapéutica convencional.....	70
4.6.1. Respuesta a los tratamientos expresados como días de evolución favorable.	72
4.6.2. Respuesta a los tratamientos expresados como días de evolución desfavorable.	80
5. CONCLUSIONES	85
6. BIBLIOGRAFIA	88

RESUMEN

Se realizó un relevamiento epidemiológico del distemper canino en la ciudad de Santa Fe, Argentina entre los años 1998 y 2009. En caninos con diagnóstico de distemper confirmado por inmunofluorescencia directa, se ensayaron tres tipos de tratamientos: convencional o de sostén, de sostén más lipopolisacáridos bacterianos y de sostén más azatioprina. La presencia de hipertermia, anorexia, secreciones oculares y signos respiratorios se observaron en forma conjunta en más del 80% de los casos. La mayor incidencia de la enfermedad se presentó en el año 1999, con un 32,79% del total de casos. El pico de casuística ocurrió en el mes de noviembre con un 22,95%. La distribución estacional fue de 33,61% en invierno, 34,43% en primavera, 15,57% en verano y 16,39% en otoño. Los machos representaron el 63,08% y las hembras el 36,92%. El 17,69% correspondió a caninos pequeños, el 42,31% a medianos y el 40,00% a grandes. El 73,64% fueron cachorros, el 24,81% adultos y el 1,55% seniles. No se observaron diferencias entre las proporciones de caninos con evolución favorable y desfavorable en los tres tratamientos realizados. La dispersión de los días de evolución favorable fue menor en los caninos que recibieron tratamiento de sostén más lipopolisacáridos bacterianos y mayor en los que recibieron tratamiento de sostén más azatioprina.

Palabras claves: Distemper canino, Epidemiología, Azatioprina, Lipopolisacáridos bacterianos

SUMMARY

An epidemiology study of canine distemper was carried out at the city of Santa Fe, Argentina between 1998 and 2009. In dogs in which canine distemper was diagnosed by direct immunofluorescent technique, three types of treatments were performed; maintenance treatment, maintenance treatment plus bacterial lipopolysaccharide, and maintenance treatment plus azathioprine. The presence of fever, anorexia, ocular discharge and respiratory signs were observed in more than the 80% of the cases. The major prevalence of the disease was presented in 1999, with 32.79% of the cases. The high incidence of the disease occurred in November; 22.95%. The seasonal distribution was 33.61% in winter, 34.43% in spring, 15.57% in summer and 16.39% in autumn. The affected males were 63.08% and the females were 36.92%. The 17.69% of the cases were small-size dogs, 42.31% were medium-size dogs, and 40.00% were big-size dogs. The 73.64% of the cases were puppies, 24.81% were adult dogs and the 1.55% were older dogs. No differences were observed between the proportions of dogs with favorable and unfavorable evolution in the three types of treatments done. The dispersion of the days in which the favorable evolution of the disease occurred was lower in dogs who received the maintenance treatment plus bacterial lipopolysaccharide, than those which received maintenance therapy plus azathioprine.

Key words: Canine distemper, Epidemiology, Azathioprine, Bacterial lipopolysaccharide

Introducción

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Reseña de la problemática

El distemper canino, también llamado moquillo o enfermedad de Carré, es considerado la patología vírica más seria que afecta a la especie (Lamb and Kolakofsky, 2001). Su agente etiológico es el virus del distemper canino (VDC) perteneciente al orden *Mononegavirales*, familia *Paramyxoviridae*, género *Morbillivirus*.

Es una enfermedad de alta morbilidad y mortalidad variable, endémica en el mundo entero, siendo susceptibles a la infección natural la mayoría de los carnívoros terrestres y en particular los miembros de las familias *canidae* (perro, perro salvaje, perro australiano, zorro, coyote, lobo y chacal, entre otros) y *mustiladae* (comadreja, hurón, visón, zorrillo, tejón, armiño, marta y nutria, entre otros). Tiene la característica de ser altamente contagiosa, afectando básicamente a cachorros menores a un año, quienes constituyen el grupo etario de mayor susceptibilidad, aunque no están exentos de padecerla caninos en cualquier etapa de su vida.

Los animales infectados eliminan el virus a través de sus secreciones corporales desde el séptimo día posinfección, aún aquellos que no presentan signos clínicos. El virus es lábil y poco resistente a las condiciones del medio ambiente (Greene and Appel, 1998).

La patogenia comienza con el ingreso del virus al organismo por vía aerógena o digestiva, y actuando directamente sobre el tejido linfoide produce inmunosupresión (Krakowka *et al.*, 1985), lo que facilita su difusión posterior a casi todos los tejidos, pudiendo derivar en una leucoencefalitis desmielinizante (Schobesberger *et al.*, 2002; Beineke *et al.*, 2009).

Dado que el virus afecta a casi todos los órganos y tejidos, los signos clínicos son variados, existiendo diversidad respecto de la duración y severidad de la presentación, que puede variar desde un cuadro subclínico hasta el desarrollo de una enfermedad grave con o sin signos nerviosos.

El primer pico de temperatura se presenta entre el tercer y el sexto día posinfección y generalmente pasa inadvertido, en tanto que un segundo pico febril aparece varios días después, tendiendo a persistir durante la evolución de la enfermedad. Las primeras

manifestaciones clínicas son depresión y anorexia con aparición de secreción ocular y/o nasal serosa al principio, para transformarse luego en mucopurulenta. Posteriormente pueden aparecer otros signos respiratorios como tos y disnea y/o gastrointestinales con predominio de anorexia, vómitos y diarreas.

En algunos individuos pueden presentarse lesiones cutáneas como hiperqueratosis en las almohadillas plantares y el hocico y/o pústulas eritematosas. Cuando la infección se produce al momento de la reposición dental, suele dejar como secuela una hipoplasia del esmalte, caracterizada por coloración parda e irregularidades en la superficie de los dientes.

Los signos nerviosos consisten en temblores que afectan a los músculos flexores, convulsiones, ataxia, estrabismo, marcha en círculo, parálisis total o parcial, tics, movimientos masticatorios involuntarios y en algunos casos neuritis óptica y daños en la retina provocando un cuadro de ceguera.

La vacunación no otorga protección permanente, por lo que se recomiendan dosis periódicas durante toda la vida. Los animales que han padecido la enfermedad adquieren inmunidad muy duradera, a menos que se expongan a infecciones masivas a una cepa muy virulenta, o presenten compromiso inmune. No se ha hallado evidencia de la existencia de animales portadores (Greene and Appel, 2006).

Existen numerosos reportes referidos al comportamiento de la enfermedad en la población, aunque ninguno de ellos es concluyente. Estos analizan los efectos de diversas variables sobre la incidencia de la enfermedad tales como edad, sexo, tamaño, raza y condiciones ambientales y climáticas.

Aunque algunos autores no han hallado diferencias de predominio de incidencia respecto del sexo de los individuos (Sarfaty *et al.*, 1986; Ernst *et al.*, 1987), otro autor reporta una mayor incidencia de la enfermedad en los machos, al tiempo que propone que la raza juega un importante papel en la diseminación de la enfermedad al documentar una mayor presentación en animales mestizos (Landeros, 1988).

Respecto de la distribución temporal de la casuística, algunos autores sostienen que ésta se presenta sin diferencias a lo largo del año (Appel, 1977; Appel and Carmichael,

1979; Morales *et al.*, 1997), mientras que Landeros (1988) afirma que se presenta un mayor número de casos en invierno. Otros autores sostienen que la incidencia de la enfermedad estaría asociada a factores como temperatura y humedad, aumentando la casuística durante los meses de otoño y primavera (Ernst y Fabrega, 1988), mientras que Pérez y colaboradores (2003) reportan una mayor casuística en los meses de otoño e invierno.

La falta de información concluyente acerca del impacto que variables tales como sexo, raza, tamaño y época del año tienen sobre la incidencia de la enfermedad, la atribuimos a la carencia de un diseño experimental adecuado para abordar la problemática. La información disponible deriva de estudios observacionales *ex post*, a partir de datos históricos obtenidos de fichas de hospitales de pequeños animales de facultades de veterinaria (Morales *et al.*, 1997; Perez *et al.*, 2003), o de clínicas veterinarias particulares (Landeros, 1988), lo cual implica un sesgo importante en los datos obtenidos, ya que no siempre es posible hallar en las fichas clínicas información acerca de todas las variables que se pretenden estudiar.

De este modo se produce una divergencia entre el número de fichas y el número de cada una de las variables en estudio, limitante que, por otra parte, es reconocida por los mismos autores (Morales *et al.*, 1997; Perez *et al.*, 2003).

El distemper canino representa un reto para el clínico de pequeños animales debido al pronóstico incierto acerca de su evolución y a la ausencia de una terapéutica específica. El tratamiento convencional es inespecífico y de sostén, enfocado a controlar las infecciones bacterianas secundarias que son de importancia capital en el curso de la enfermedad, al mantenimiento del estado general, y a la atención de los signos observados, pudiendo estar compuesto a grandes rasgos por:

- antibioticoterapia de amplio espectro.
- fluidoterapia.
- antipiréticos.
- vitaminas, en especial del complejo B para reemplazar las pérdidas por anorexia y para estimular el apetito.
- medicación anticonvulsiva y sedante (en caso de mioclonía por lesión neurológica).
- aplicación de vacunas a virus atenuados (Greene and Appel, 1998).

En los últimos años se ha divulgado entre los profesionales de la especialidad dos alternativas terapéuticas consistentes en:

- estimular la inmunidad innata, y de esa manera mejorar la evolución del curso clínico de la enfermedad.
- emplear fármacos que actúen interfiriendo con la replicación viral, limitando la acción del virus.

En referencia al primer punto se ha preconizado el empleo de inmunoestimulantes, que son moléculas que actúan mejorando la respuesta inmune innata del organismo. Éstos comprenden un grupo de sustancias naturales y sintéticas entre las que se encuentran los lipopolisacáridos bacterianos (LPS_B) (Tizard, 2009).

De manera específica, se han reportado los beneficios del empleo del mencionado principio activo presente en ciertos preparados comerciales, algunos ya fuera del mercado como Interferit[®], y otros que actualmente se comercializan, por ejemplo Ribozim[®]-RN 205.

Desafortunadamente, solo se dispone de información limitada acerca de su ventaja terapéutica, la cual es proporcionada por los laboratorios fabricantes y proveniente de casos clínicos aislados. Al presente no se cuenta con información derivada de estudios de eficacia que avalen científicamente el empleo de tales preparados.

En relación a la segunda alternativa, un fármaco postulado para mejorar el porcentaje de éxito terapéutico es la azatioprina (AZP) (Aixelá, 2001). Se trata de un análogo de las bases purínicas que actúa interfiriendo en la síntesis de los ácidos nucleicos.

Este autor argumenta que el virus durante su fase de replicación, sería mucho más afectado que las células del hospedador al incorporar a su genoma mayor cantidad de análogos de bases purínicas. Sin embargo, éstos también pueden ser incorporados en los genes de las células del hospedador, produciendo efectos secundarios colaterales. En medicina humana, la indicación terapéutica de la AZP es su utilización como agente inmunosupresor para evitar el rechazo en transplantes y en el tratamiento de enfermedades autoinmunes (Krensky *et al.*, 2007).

Esta supuesta actividad antivírica de la AZP tiene impacto en la opinión de los clínicos de la especialidad, al punto que actualmente existe en el mercado farmacéutico veterinario una formulación comercial de AZP (Azatioprina J'anvier[®], Laboratorios J'anvier), donde una de las indicaciones de empleo preconizada por el fabricante es el tratamiento del distemper canino, basándose en el trabajo reportado por Aixelá (2001). Al igual que en el caso de los LPS_B, tampoco se dispone de estudios clínicos que avalen científicamente la eficacia de tales compuestos.

En vista de lo expuesto, consideramos importante caracterizar los aspectos fundamentales de presentación, epidemiología y evolución clínica del distemper canino. A tal efecto, diseñamos y realizamos un estudio de relevamiento epidemiológico circunscrito a la ciudad de Santa Fe y su área de influencia.

Asimismo, consideramos que para una terapéutica de base científica y racional, es necesario contar con un estudio clínico serio que compare la eficacia derivada del uso de LPS_B o AZP en el tratamiento de la enfermedad, generando de esta manera información confiable acerca de la conveniencia o no del empleo de estas drogas.

1.2. Hipótesis experimentales

Sobre la base de los conceptos expuestos, se formularon tres hipótesis de trabajo:

- la edad y las variables climáticas y ambientales tienen influencia directa en la incidencia del distemper canino y en la distribución temporal de su casuística a lo largo del año.
- los LPS_B impactan favorablemente en la evolución del cuadro clínico, por producir estimulación inespecífica de la inmunidad innata del hospedador.
- la AZP es una droga inmunosupresora con acción lítica sobre los linfocitos y su utilización no aporta ninguna ventaja terapéutica en el tratamiento del distemper canino.

1.3. Objetivos

1.3.1. Objetivo general

Realizar un estudio a fin de caracterizar aspectos clínico-epidemiológicos del distemper canino en la ciudad de Santa Fe y zona de influencia y evaluar la eficacia terapéutica de la incorporación de LPS_B o AZP al tratamiento de sostén.

1.3.2. Objetivos particulares

- determinar la frecuencia mensual, estacional y anual de presentación de la enfermedad en función de variables climáticas y ambientales.
- establecer si existe asociación de sexo, tamaño y edad con la casuística de la enfermedad.
- comprobar la eficacia terapéutica del tratamiento con LPS_B o AZP respecto del tratamiento convencional.
- analizar la evolución clínica de los pacientes según tratamiento, factores ambientales y variables climáticas (temperatura y humedad).

Revisión bibliográfica

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.2. Distemper canino; epidemiología y terapéutica

2.2.1. Introducción

El moquillo canino, también llamado distemper o enfermedad de Carré, se considera desde mediados del siglo XX, una de las patologías víricas más comunes de los caninos de todo el mundo. Fue descrita por Edward Jenner en 1809 y su etiología viral demostrada por Carré en 1906.

El espectro de hospedadores naturales comprende miembros de las familias *Canidae*, *Felidae*, *Procyonidae* y *Mustelidae*, entre otros. Afecta un rango importante de órganos, incluyendo tejidos linfoides, tractos respiratorio e intestinal, piel y encéfalo, siendo sus manifestaciones patológicas más severas la inmunosupresión y una leucoencefalitis desmielinizante (Krakowka *et al.*, 1985).

Si bien las primeras vacunas inactivadas estuvieron disponibles desde la década del 40, no fue hasta los años 60 en los que se observó un cambio drástico en la prevención de la enfermedad al aparecer vacunas a virus vivo modificado.

Epidemias recientes de distemper canino han sido observadas en Francia, Alemania, USA, Japón y Finlandia, demostrando la importancia de la vacunación regular como una herramienta protectora altamente eficiente (Beineke *et al.*, 2009).

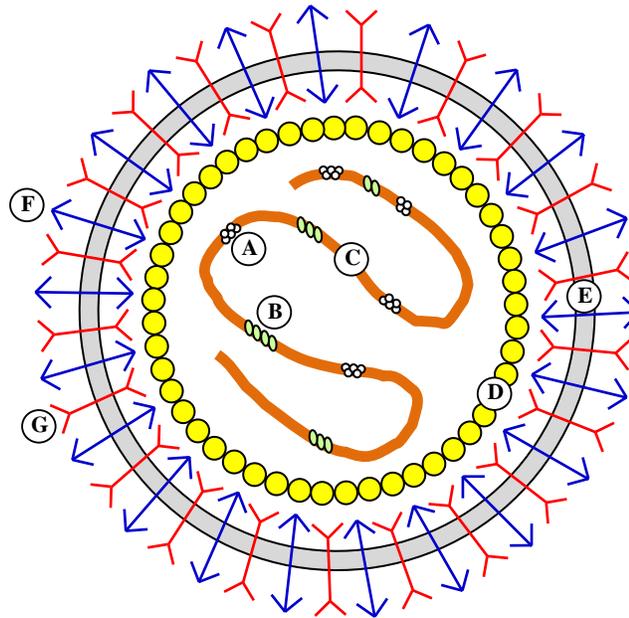
Además, brotes ocasionales de la enfermedad pueden ser observados en cohortes vacunadas, posiblemente debido a la introducción o circulación de cepas genéticamente diferentes (Mori *et al.*, 1994; Scagliarini *et al.*, 2003; Gallo Calderón *et al.*, 2007). En los últimos años parece haber aumentado la incidencia de la enfermedad (Appel and Summers, 1999).

2.2.2. Agente etiológico

El agente causal es el virus del distemper canino (VDC), perteneciente al orden *Mononegavirales*, familia *Paramyxoviridae*, género *Morbillivirus* (**Figura 1**) que también comprende los virus del sarampión, de la peste de los rumiantes (*Rinderpest*), y virus de distemper de delfines, marsopas y focas (Lamb and Kolakofsky, 2001).

Es un virus envuelto, con una nucleocápside de simetría helicoidal que consiste en una cadena única de ARN de sentido negativo y 15882 nucleótidos y proteínas asociadas: nucleoproteína (N), fosfoproteína (P) y polimerasa mayor (L). Además, conforman la partícula viral la proteína de membrana (M), la hemaglutinina/neuraminidasa (HN) y la proteína de fusión (F) (Örvell, 1980; Diallo, 1990).

La envoltura lipídica contiene las dos glicoproteínas de superficie F y HN, las cuales median la entrada y salida viral de la célula hospedadora.



- A- Polimerasa mayor (L)
- B- Fosfoproteína (P)
- C- Nucleoproteína (NP); en su interior se halla el ARN de cadena simple (-)
- D- Proteína de matriz (M)
- E- Envoltura lipoproteica (E)
- F- Proteína de fusión (F)
- G- Hemaglutinina neuraminidasa (HN)

Figura 1. Estructura del virus del distemper canino.

El virus permanece viable entre valores de pH de 4,5 y 9, es sensible a la luz ultravioleta, al calor, a la desecación y se destruye cuando es expuesto a temperaturas de 50 a 60 °C durante 30 minutos. Sin embargo puede sobrevivir durante una hora a una temperatura de 37°C. El tiempo de sobrevivencia se prolonga en temperaturas frías, siendo capaz de mantenerse viable por 2 o 3 semanas a temperaturas entre 0 y 4 °C.

Almacenado a -65°C puede conservarse por más de siete años. Como todo virus envuelto es sensible al éter, cloroformo y desinfectantes tales como formol (0,5%), fenol (0,75%) y amonios cuaternarios (0,3%), por lo que los procedimientos de desinfección de rutina son efectivos para destruirlo (Appel, 1977).

La replicación tiene lugar en el citoplasma a las 14 a 24 horas posinfección. Comienza con la adhesión de la proteína HN del virus a receptores celulares tales como sialoglicoproteínas o glicolípidos.

La proteína F interviene en la fusión de la envoltura viral con la membrana plasmática a un pH fisiológico. El genoma ARN de cadena simple y polaridad negativa debe transcribirse a un intermediario autorreplicativo antes de generar los ARNm. Para que esto ocurra son necesarias las nucleocápsides libres e intactas con sus tres proteínas asociadas (N, P y L).

Una vez que la nucleocápside es liberada en el citoplasma, la polimerasa dependiente del ARN inicia la transcripción desde el extremo 3' hacia el final del genoma, sintetizándose una cadena de polaridad positiva. A partir de ella se generan los ARNm correspondientes a cada gen.

Los genes en el ARN viral se hallan separados mediante secuencias cortas intergénicas de residuos uracílicos, y son capaces de generar una cola larga de poli A en cada ARNm por un proceso reiterativo de copiado, interrupción y reinicio de la transcripción. Cada ARNm se cliva y las enzimas continúan transcribiendo el siguiente gen.

El ensamble y maduración de los viriones involucra la incorporación de glicoproteínas virales en la membrana plasmática de la célula hospedadora, la asociación de la proteína M y de otra proteína no glicosilada con la membrana celular modificada y el alineamiento de la nucleocápside con la proteína M.

La liberación es por gemación de los viriones maduros que se cubren de una envoltura que contiene lípidos de origen celular y glicoproteínas virales. El ARN neoformado se asocia a proteínas de la nucleocápside, que se producen en exceso y se

acumulan en el citoplasma, dando lugar a la formación de cuerpos de inclusión característicos (Lamb and Kolakofsky, 2001).

Mundialmente se reconoce un solo serotipo. No obstante, circulan varios genotipos de distinta virulencia y tropismo celular (Lamb and Kolakofsky, 2001). Algunas cepas están asociadas con polioencefalitis, ej.: cepa Snyder Hill, mientras otras inducen leucoencefalitis desmielinizante ej.: cepas R252 y A75-17 (Krakowka and Koestner, 1997; Orlando *et al.*, 2008).

Aunque los análisis de secuencia de aislamientos de campo revelan varios clusters de cepas de VDC, en brotes recientes se ha observado una considerable estabilidad genética (Haas *et al.*, 1997; Frisk *et al.*, 1999).

Estudios posteriores de análisis de secuencia completa de genes de HN y F y parcial de P realizados en Estados Unidos, sugirieron en dos cepas una relación evolutiva similar a la del distemper de focas; ubicadas en el árbol de cepas de VDC se demostró diferencia genética con cepas vacunales y las previamente reportadas en Norte América (Pardo *et al.*, 2005).

La cepa 007Lm, aislada en Japón a partir de un canino vacunado enfermo, ha sido clasificada como perteneciente a un cluster lejano de las vacunales en los árboles filogenéticos de genes de HN y P (Lan *et al.*, 2005).

Por otra parte, un estudio de caracterización genética con análisis filogenético de secuencias parciales de aminoácidos de HN realizado en Argentina, mostró un cluster estrecho para las cepas locales, claramente distinto del de las cepas vacunales de otro origen.

Una de las cepas locales, Arg 23 muestra diferencias que sugieren que dos diferentes genotipos patogénicos de VDC circulan corrientemente en el país, uno de ellos claramente predominante (Gallo Calderon, *et al.*, 2007).

2.2.3. Hospedadores

El rango natural de hospedadores comprende familias del orden *Carnívora*, como *Canidae* (perro, zorro), *Procyonidae* (mapache), *Mustelidae* (hurón), *Ursidae* (panda gigante), *Herpestidae* (mangosta), *Hyaenidae* (hiena), *Ailuridae* (panda rojo), *Viverridae* (civeta) y *Felidae* (león).

En los últimos años han sido observadas enfermedades similares al distemper en grandes félicos en el Parque Nacional Serengeti en Tanzania (Roelke-Parker *et al.*, 1996) y en zoológicos de Norteamérica (Appel *et al.*, 1994), en pecaríes de collar (*Tayassu tajacu*) en Arizona (Appel *et al.*, 1991) y en primates no humanos (*Macaca fuscata*) en Japón (Yoshikawa *et al.*, 1989). Las focas, además de tener un virus específico, pueden llegar a infectarse con el de los caninos (McCullough *et al.*, 1991). El hurón, dada su extrema susceptibilidad, es utilizado ampliamente como modelo para estudios de virulencia e inmunosupresión (Messling *et al.*, 2003).

Orden	Descripción
Ailúridos	panda rojo
Cánidos	perro, coyote, dingo, lobo, zorro
Hyaenidos	hiena
Mustélidos	hurón, marta, visón, nutria, zorrillo, tejón
Prociónidos	coatí, kinkajú, mapache
Ursidos	oso panda gigante
Vivérridos	binturong, linsang, civeta
Herpéstidos	mangosta, suricata
Félicos	chita, león, jaguar, margay, ocelote

Tabla 1. Animales del orden de los carnívoros susceptibles al distemper canino.

En el laboratorio el virus replica en cultivos primarios o en líneas celulares establecidas, entre las que se destacan las de riñón canino (MDCK) y, en segundo lugar, las de mono verde africano (VERO). En ellas produce formación de sincicios, vacuolización, lisis celular y formación de inclusiones acidófilas intracitoplasmáticas e intranucleares. Para una correcta replicación necesita adaptarse por pasajes, y la adición de tripsina al medio para clivar la proteína F (Reutemann *et al.*, 2006).

2.2.4. Epidemiología

Luego de la infección, el animal puede eliminar virus en gran escala durante 60 a 90 días por vía oronasal, aunque cualquier descarga puede contenerlo. El ingreso al organismo se produce primariamente por contacto directo e inhalación de virus transportado por gotitas (Krakowka *et al.*, 1980), por lo que los animales infectados son quienes lo mantienen en la población. Se estima que entre el 25% y el 75% de los caninos no enferman, presentando la forma subclínica (Greene and Appel, 1998).

Son numerosos los autores que han reportado datos acerca del comportamiento de la enfermedad en la población, aunque estos difieren respecto de la magnitud del efecto de variables tales como edad, sexo, tamaño corporal y raza en la incidencia de la misma. Asimismo existen divergencias acerca del impacto de las condiciones ambientales y de los factores climáticos sobre la distribución temporal de la casuística.

La edad parece ser un factor de capital importancia en la incidencia, ya que los animales más susceptibles son aquellos que presentan entre 3 y 6 meses de edad. En este sentido, el continuo nacimiento de cachorros en los centros urbanos proporciona de manera constante individuos susceptibles. Este fenómeno parece no presentarse en centros con baja densidad poblacional, donde en general enferman animales de todas las edades (Greene and Appel, 1998).

Se ha reportado mayor incidencia en los machos (Landeros, 1988) al tiempo que otros autores como Sarfaty y colaboradores (1986) y Ernst y colaboradores (1987) no han hallado diferencias asociadas al sexo.

Se menciona que las razas braquicéfalas son menos propensas a padecer la enfermedad que las dolicocefalas, pudiendo entre éstas últimas mencionarse la Greyhound, Siberian Husky, Weimaraner, Samoyedo y Alaskan Malamut (Greene and Appel, 1998). También se ha propuesto que existe una mayor incidencia de la enfermedad en animales mestizos (Landeros, 1988).

Aunque muchos autores sostienen que la enfermedad se presenta sin fluctuaciones a lo largo de todo el año (Appel, 1977; Appel and Carmichael, 1979; Morales *et al.*, 1997),

otros afirman haber detectado una mayor proporción de casos durante el período invernal (Landeros, 1988).

Algunos autores han proporcionado evidencia acerca de la relación entre factores como temperatura y humedad y frecuencia de la casuística durante los meses de otoño y primavera (Ernst y Fabrega, 1988), al tiempo que otros aseguran que la casuística es mayor en los meses de otoño e invierno (Perez *et al.*, 2003).

2.2.5. Patogenia

El virus inhalado, dentro de las primeras 24 horas infecta células dendríticas del tracto respiratorio, mediante la unión al receptor CD150⁺ se replica en ellas y se disemina a través de vasos linfáticos hacia las amígdalas y ganglios locales, alcanzando a todos los tejidos linfáticos regionales. Entre el cuarto y el sexto día, se aprecia replicación importante en estas estructuras (Appel, 1970).

En las células inmunes replica en el citoplasma, sintetiza el antígenoma (RNA⁺) que es el mensajero y forma, junto a la polimerasa y su cofactor la fosfoproteína, un complejo ribonucleoproteico que evita el reconocimiento de los intermediarios del RNA de doble hebra por parte del receptor de tipo toll (TLR-3) que es un receptor de membrana con un dominio citoplasmático, lo que inhibe las vías que activan la expresión de citocinas proinflamatorias, quimiocinas, moléculas de adhesión y receptores inmunológicos, propios de la inmunidad innata (Curran y Kolakofsky, 2000).

Además, en el ciclo replicativo son generados dos productos derivados del gen P, de gran influencia en la patogénesis, la proteína V, que inhibe las vías de señalización de interferón, citocinas proinflamatorias y citocinas Th₁ y Th₂ específicas e interfiere fundamentalmente con la respuesta Th₁ antiviral y la proteína C que es un factor de infectividad que asegura el ensamble y la liberación de partículas virales estables que sustentan las fases tardías del cuadro multisitémico (von Messling, *et al.*, 2006).

Entre la segunda y tercer semana ocurre una primer viremia causada por diseminación viral fundamentalmente en linfocitos, momento en que algunos caninos desarrollan una fuerte respuesta inmune humoral y celular, teniendo la posibilidad de

recuperarse sin signos clínicos posteriores; otros desarrollan una débil respuesta y presentan enfermedad aguda o subaguda (Appel *et al.*, 1984).

Como consecuencia hay una amplia proliferación en órganos linfoides, lo que se corresponde con el aumento inicial de la temperatura corporal y es a su vez causa de la leucopenia observada, que es provocada principalmente por daño viral a las células linfoides, tanto al tipo B como al T, en coincidencia con la aparición de interferón circulante (Appel, 1969; Krakowka *et al.*, 1985).

Luego se produce la segunda viremia con diseminación por vía sanguínea y linfática a los tejidos hematopoyéticos distantes, en que linfocitos y macrófagos infectados transportan el virus a los epitelios de los tractos digestivo, respiratorio y urogenital, a la úvea y al SNC. El sulfato de heparina de las células epiteliales actúa como receptor de la H y ocurre una diseminación epiteliopantropica tardía con patología impredecible (Zhao *et al.*, 2008). Se produce una infección generalizada de todos los tejidos linfoides incluyendo bazo, timo, nódulos linfáticos, médula ósea, tejidos linfoides asociados a mucosas, macrófagos en la lámina propia del tracto gastrointestinal y células de Kupffer.

Para el día 14, los animales con altos títulos de anticuerpos y adecuada citotoxicidad mediada por células, eliminan el virus de la mayoría de los tejidos y no muestran signos de enfermedad. En los demás, se produce infección de tejidos parenquimatosos en todo el organismo (Appel, 1969; Okita *et al.*, 1997).

La infección de tonsilas y placas de Peyer hace caer la inmunidad por IgA en mucosas, lo que facilita el ingreso de infecciones oportunistas. Al séptimo día hay una disminución del 80% de mononucleares periféricos con 40 a 60% de LT y LB infectados y menor proporción de macrófagos por su limitada expresión de DC150 (von Messling, *et al.*, 2004).

Así, el VDC puede ser hallado en células de los tractos respiratorio, gastrointestinal y urinario, sistema endocrino, tejidos linfoides, sistema nervioso central (SNC) y vasos, incluyendo queratinocitos, fibroblastos, trombocitos y diferentes células linfoides así como bronquiales, endoteliales, epiteliales y neuroectodermo (Baumgärtner *et al.*, 1989; Gröne *et*

al., 2004; Koutinas *et al.*, 2004). Las infecciones bacterianas secundarias aumentan la gravedad de la enfermedad clínica.

El VDC puede ocasionar abortos debidos a los severos efectos sistémicos de la infección de la madre, sin demostración de virus en placenta o feto. También puede atravesar sin dificultad la placenta e invadir el feto pudiéndole producir encefalitis y muerte temprana por infección secundaria asociada a inmunosupresión (Krakowka *et al.*, 1977).

La neuroinvasión del VDC ocurre predominantemente por vía hematógica (Krakowka, 1989) y parece coincidir con la aparición de elevados niveles de IgG contra la glucoproteína H (Greene and Appel, 2006). El antígeno viral es detectado primero en los endotelios de capilares y vénulas del SNC a los 5-6 días posinoculación y/o en linfocitos perivasculares a los 8 días (Summers *et al.*, 1979).

Algunas cepas, durante la invasión masiva de células epiteliales de la mucosa respiratoria infectan neuronas receptoras cercanas y a través de sinápsis neuronales alcanzan el nervio y bulbo olfatorio, lugares donde comienza el proceso patológico diseminándose luego al resto del SNC (Rudd *et al.*, 2006).

A los 10 días posinoculación puede ser observada una infección productiva del epitelio del plexo coroideo, con liberación de virus progenie en el líquido cefalorraquídeo (LCR), seguida por infección ependimal y diseminación viral a la sustancia blanca subependimal (Vandeveldel *et al.*, 1985).

El esquema secuencial de la patogénesis del distemper canino, se encuentra representado en la **Figura 2**.

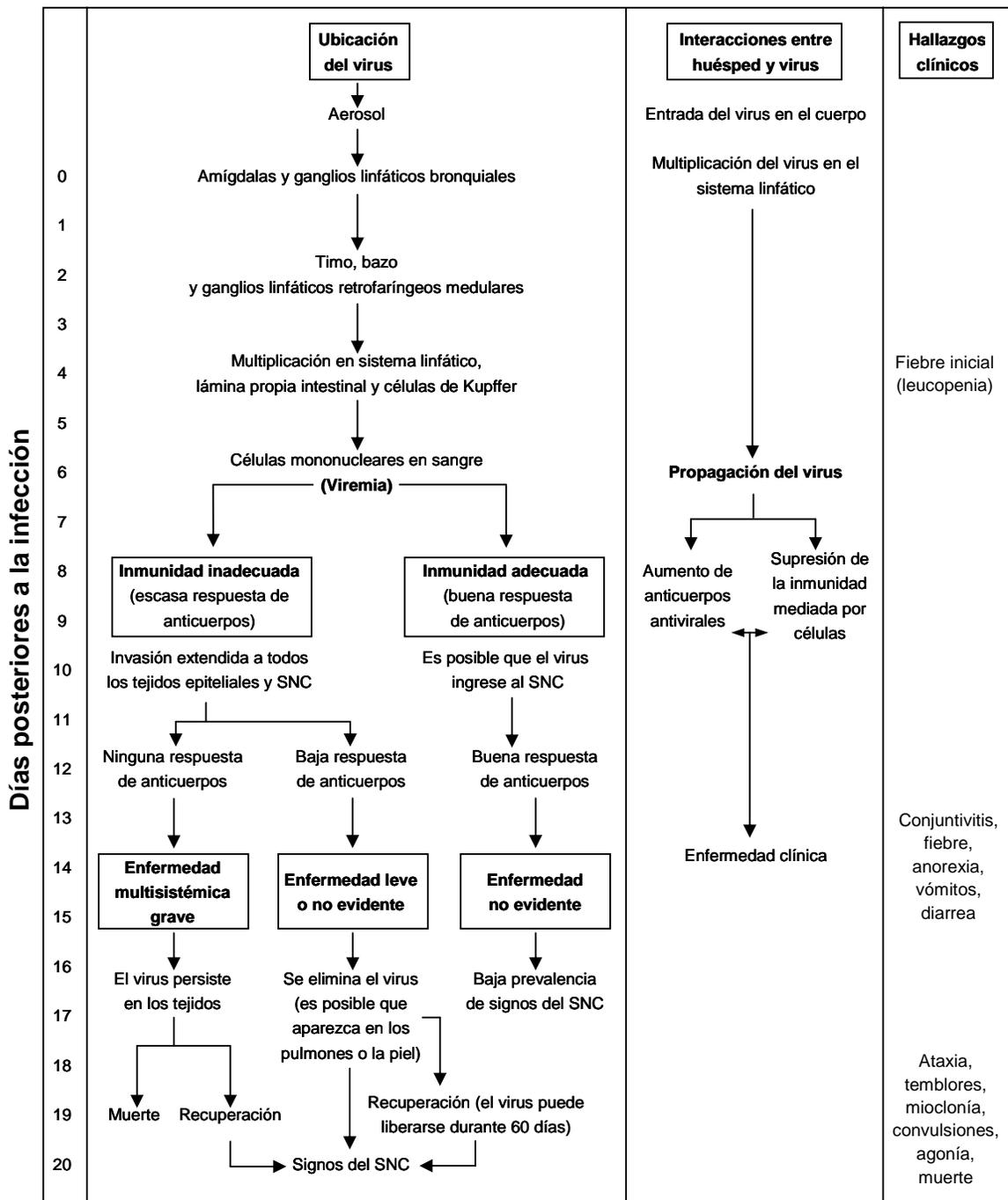


Figura 2. Esquema secuencial de la patogénesis del distemper canino, adaptado de Greene y Appel (2006).

Los estudios para seguir la ruta del VDC dentro del cerebro mostraron infección de la sustancia blanca ependimal y subependimal, lo que indica difusión en el SNC vía LCR (Vandeveldt *et al.*, 1985). Además, hay diseminación directa desde células meníngeas de la piamadre (Baumgärtner *et al.*, 1989).

El virus es eliminado de la sangre periférica y de algunos órganos conforme al aumento de anticuerpos. En algunos casos, puede persistir en ciertos tejidos incluyendo úvea, SNC, órganos linfoides y almohadillas (Appel, 1970; Zurbriggen *et al.*, 1995; Greene and Appel, 1998; Gröne *et al.*, 2004).

La recuperación o la muerte pueden demorarse por 2 o 3 meses, siendo posible la presencia de manifestaciones nerviosas sin otros signos previos de enfermedad generalizada (Appel, 1969).

Hay cepas virales que inducen infección aguda fatal predominantemente en la sustancia gris del SNC donde provocan destrucción neuronal.

Dado que los dos procesos patológicos más relevantes y severos del distemper canino son la inmunosupresión y la forma nerviosa de la enfermedad, es que a continuación se desarrollan en profundidad cada uno de ellos.

2.2.5.1. Inmunosupresión

Al igual que otros *Morbillivirus* como los virus del sarampión y rinderpest, el VDC es un agente infeccioso linfotrópico y altamente inmunosupresor. La infección establecida, causa una larga y profunda inhibición de las funciones inmunes celular y humoral caracterizada por pérdida de linfocitos y leucopenia, lo que transforma al enfermo en altamente susceptible a infecciones oportunistas (Krakowka *et al.*, 1975).

Las células T son más afectadas que las B y hay rápida depleción de linfocitos T CD4⁺ (auxiliares), condición que dura varias semanas, mientras que las células T CD8⁺ (citotóxicas) son afectadas de manera menos severa y se recobran relativamente rápido (Vandeveldt, 2004). Durante la fase aguda de distemper canino, la linfopenia se caracteriza por una depleción transitoria de células T CD4⁺, T CD8⁺ y B CD21⁺ en la sangre periférica.

El reducido número de células inmune circulantes puede considerarse una secuela debida a daño celular en la producción de los órganos linfoides primarios y secundarios, así como por apoptosis de leucocitos de la sangre periférica.

La muerte celular programada puede ser detectada en una cantidad importante de linfocitos no infectados, indicando la existencia adicional de mecanismos de apoptosis independientes del virus. Por consiguiente, además de la acción directa del virus, deben considerarse otros mecanismos para inducir apoptosis, tales como sobreactivación del sistema inmune innato (Moro *et al.*, 2003).

Se han realizado estudios apuntando al tropismo del VDC por los linfocitos (Appel *et al.*, 1982). Investigaciones *in vitro* demostraron que el linfotropismo del VDC se basa presumiblemente en la unión de la molécula de señal de activación de linfocitos CD 150⁺ con la proteína viral HN, seguido por la entrada del agente a la célula.

La molécula de señal de activación de linfocitos es expresada en una variedad de órganos en caninos sanos; en la infección por VDC, su expresión se acentúa en células linfoides, indicando una posible estrategia viral para incrementar su diseminación en el hospedador (Wenzlow *et al.*, 2007).

La presentación del antígeno también es afectada, dado que la molécula de señal de activación de linfocitos es expresada en células dendríticas maduras y monocitos activados (Tatsuo and Yanagi, 2002). Una proteína de transmembrana (CD9) es asociada con la inducción de fusiones célula-célula y formación de sincicios celulares por el VDC, sin que se observen fusiones virus-célula.

Sin embargo, desde que se demostró la unión no directa de esta proteína con el virus, CD9 es considerada un cofactor para la infección viral, posiblemente como parte de un receptor complejo para VDC, o debido a señales intracelulares que incrementan la expresión o actividad de un receptor molecular (Löffler *et al.*, 1997).

2.2.5.2. Distemper nervioso

La aparición de lesiones en el SNC depende de la cepa del virus, la edad y el nivel de respuesta inmune del animal afectado. En general, pueden distinguirse una polioencefalitis y una leucoencefalitis, caracterizadas por diferentes patrones de patogénesis y distribución de lesiones.

La formación de placas de leucoencefalitis desmielinizante es la secuela más común y es un proceso bifásico (Baumgärtner and Alldinger, 2005). El inicio se debe a una acción directa del virus, donde hay una expresión intralesional prominente de proteínas virales y ARNm. Las lesiones tempranas son acompañadas por la presencia de pocos linfocitos T CD8⁺ y escasas células T CD4⁺ y una expresión incrementada de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de tipo II (CMH II).

En esta fase, hay inducción de la producción de factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), un receptor de hialuronato (CD44) y las metaloproteinasas de matriz (MMPs), así como sus inhibidores (TIMPs). Como segunda fase, el progreso de las placas parece ser un proceso inmunopatológico.

La fuerte reducción o ausencia de proteínas virales y expresión de ARNm están asociadas a una respuesta inmune vigorosa. Los linfocitos T CD8⁺ dominan en las lesiones, mientras que los linfocitos T CD4⁺ y las células B se hallan principalmente en el espacio perivascular. De manera simultánea hay una fuerte expresión de moléculas del CMH II y de las citocinas proinflamatorias IL-6, IL-8, IL-12 y TNF- α .

Las citocinas antiinflamatorias IL-10 y el factor transformante del crecimiento beta (GTF β) no son influenciados por la infección, mientras que la producción de CD44, TIMPs y MMPs está fuertemente disminuída. En suma, en la leucoencefalitis desmielinizante inducida por el VDC, la génesis de la placa es un proceso bifásico con varios factores asociados con el inicio de la lesión o su progresión (Beineke *et al.*, 2009).

Estudios detallados de diseminación de virus dentro del SNC indican que puede ser observada una fase poco común y breve de enfermedad en la sustancia gris previo al desarrollo de leucoencefalitis desmielinizante (Summers *et al.*, 1984). Basado en esta observación, ha sido propuesto que ciertas infecciones de VDC pueden ingresar el SNC afectando la sustancia gris y más tarde la sustancia blanca.

Esto es sustentado por hallazgos de lesiones subpiales en el cerebelo y la presencia de células positivas al antígeno VDC en la piamadre y la materia gris subyacente en la fase temprana de la infección. El punto final es determinado mayormente por la cepa del virus (Summers *et al.*, 1984).

La persistencia viral parece ser un importante factor para la inducción de mecanismos inmunes en la fase crónica de la leucoencefalitis desmielinizante (Gaedke *et al.*, 1999). Al respecto, los factores que favorecen la persistencia incluyen una infección no citolítica y escasa liberación de progenie viral, limitando la exposición del antígeno a las células de la inmunidad local (Zurbriggen *et al.*, 1995).

En el SNC, pueden ser infectados astrocitos, microglia, oligodendrocitos, neuronas, células endoteliales y células del plexo coroideo. Los astrocitos son la principal población celular infectada en placas tempranas (Orlando *et al.*, 2008). Las células de la microglia son los principales elementos efectores con que el cerebro responde a eventos patológicos.

Su posible rol en la desmielinización inicial no inflamatoria en la infección por VDC es abonada por la clara asociación entre su activación y la desmielinización. Esto sugiere fuertemente que la microglia contribuye a la desmielinización aguda en el distemper (Stein *et al.*, 2004).

La expresión de antígeno en neuronas, observada en algún tipo de distemper nervioso durante la fase temprana, y más prominentemente en la polioencefalitis, está asociada con una cantidad desproporcionadamente baja de proteína viral comparada con el ARNm (Nessler *et al.*, 1999).

La polioencefalitis, incluyendo la encefalitis de los perros viejos y la encefalitis posvacunal es una rara manifestación de la infección por el VDC y está localizada en áreas corticales y núcleo del tronco cerebral. Las neuronas y los astrocitos protoplasmáticos representan las poblaciones celulares mayormente afectadas. En contraste, la leucoencefalitis desmielinizante es una manifestación mucho más común del distemper canino (Nessler *et al.*, 1999).

La migración inicial de células T está sospechada de ser mediada por citocinas derivadas de la microglia, tales como IL-8. Una acumulación de células inmunes en el SNC durante los estadios tempranos de la enfermedad puede facilitar el desarrollo tardío de una respuesta inmune intratecal y dar lugar a complicaciones inmunopatológicas asociadas (Tipold *et al.*, 1999).

El incremento de la expresión de moléculas del CMH II durante la progresión de lesiones de la leucoencefalitis desmielinizante, y una reducción simultánea de la expresión de proteínas virales en el SNC, indican una participación de antígenos no virales como gatillo de procesos inmunmediados en la fase crónica de desmielinización (Alldinger *et al.*, 1996).

Aunque la pérdida de mielina en lesiones tempranas ha sido atribuida a procesos mediados directa o indirectamente por virus sobre los oligodendrocitos, en lesiones crónicas ocurre como daño colateral. Esta desmielinización crónica inflamatoria, puede ser debida al efecto nocivo sobre la mielina por parte de enzimas proteolíticas liberadas por macrófagos/microglia, estimulados en ausencia de infección detectable de oligodendrocitos (Cammer *et al.*, 1978).

La activación de esas células, caracterizada por un incremento en la expresión de CMH II y de moléculas de adhesión, conduce a la liberación de factores tóxicos, al incremento de la actividad fagocítica y a la producción de radicales de oxígeno (Bürge *et al.*, 1989).

Además, una respuesta inmune humoral antiviral puede conducir a la destrucción de oligodendrocitos como “espectadores inocentes”. Se sospecha que el incremento en la producción de anticuerpos intratecales debido a la presencia de células B intracerebrales es responsable de acelerar la destrucción de la mielina en la leucoencefalitis desmielinizante crónica.

Otro mecanismo posible de desmielinización postulado, es una citotoxicidad humoral dependiente de anticuerpos y mediada por complemento (Vandeveldel *et al.*, 1986). Los macrófagos residentes en el SNC, la microglia, así como la invasión de monocitos asociada con la reacción inflamatoria también pueden jugar un rol central en los procesos de desmielinización (Stein *et al.*, 2008).

En el estado crónico, las células dendríticas sirven como células primarias hospedadoras para el virus. El cambio de tropismo celular se presume una consecuencia de la respuesta inmune y puede representar un mecanismo de persistencia viral, tal como se describe para las neuronas y los oligodendrocitos (Wünschmann *et al.*, 2000).

Las células T autorreactivas también pueden ser las responsables de la inducción de inmunidad celular específica antimielina observada, vía epitopes diseminados secundariamente al daño de la mielina en el SNC (Wünschmann *et al.*, 2000).

Sin embargo, el rol preciso de esta respuesta inmune contra sí mismo y de los autoanticuerpos en la patogénesis de la desmielinización del SNC permanece indeterminada. El hallazgo simultáneo de un alto número de linfocitos T CD8⁺ intralesionales y perivasculares es sugestivo de una citotoxicidad mediada por células T dependientes de anticuerpos (Wünschmann *et al.*, 1999).

Además, los cambios inmunofenotípicos son indicativos de una reacción de hipersensibilidad de tipo retardada en lesiones avanzadas (Wünschmann *et al.*, 1999). El hallazgo de IFN- α en el LCR de perros con infección del SNC lo señala como un marcador válido para determinar la persistencia del VDC en el SNC (Tsai *et al.*, 1982).

La producción inicial de TNF- α por astrocitos puede conducir a un círculo vicioso de atracción de células inflamatorias en las lesiones del SNC, con incremento de la síntesis de citocinas y al desarrollo del estado crónico de leucoencefalitis desmielinizante. La producción de IL-12 en las lesiones de desmielinización de cerebros infectados por el VDC se supone que promueve una respuesta inmune Th₁ parcial (Gröne *et al.*, 2000).

Por otra parte, la disrupción de la barrera hematoencefálica por enzimas proteolíticas es considerada un factor central para la afluencia de células inflamatorias y la progresión de las lesiones en las enfermedades desmielinizantes.

Los astrocitos representan la principal célula blanco del VDC. Fisiológicamente, forman la barrera hematoencefálica y son una fuente mayor de proteínas de la matriz extracelular, jugando un rol esencial en el mantenimiento de la integridad estructural del SNC (Montgomery, 1994).

2.2.6. Manifestaciones clínicas

Existe gran variación en cuanto a la severidad y la duración de la enfermedad clínica, aproximadamente el 50% de los perros infectados desarrollan enfermedad subclínica o muy leve (Appel, 1970).

Los signos varían desde no detectables, hasta la presentación de un cuadro severo, con o sin compromiso nervioso y un 50% de mortalidad (Appel, 1970). El desarrollo de fiebre bifásica representa un hallazgo clínico característico (Wright, 1974). El primer aumento de la temperatura ocurre entre 3 y 6 días posinfección y puede pasar desapercibido, mientras que el segundo pico aparece varios días después y se caracteriza por hipertermia generalmente continua seguida por la aparición de signos respiratorios y/o gastrointestinales.

Las manifestaciones respiratorias consisten en rinitis serosa o mucopurulenta, neumonía intersticial y bronquiolitis necrotizante, la cual se complica a menudo con una bronconeumonía supurativa debido a infecciones bacterianas secundarias (Caswell and Williams, 2007).

La infección entérica conduce a enteritis catarral con depleción de las Placas de Peyer (Krakowka *et al.*, 1985; Greene and Appel, 1998). En caninos naturalmente infectados, puede ser hallada una dermatitis pustular, también llamada exantema por distemper, localizada en muslos, abdomen ventral y en las superficies internas del pabellón auricular. Otra manifestación cutánea menos común está caracterizada por hiperqueratosis de las almohadillas plantares y del epitelio nasal (Moritz *et al.*, 2000).

El VDC también infecta los ameloblastos en los dientes en desarrollo, causando hipoplasia permanente del esmalte (Dubielzig *et al.*, 1981). En caninos jóvenes que sufrieron la forma sistémica del VDC ha sido descrita una osteoesclerosis metafísea o crecimiento retardado en reja, debida a persistencia viral en la esponjosa de la metafísis de los huesos largos (Baumgärtner *et al.*, 1996). Otra consecuencia común e importante es una depleción generalizada de órganos linfoides asociada con inmunosupresión.

Algunos perros desarrollan signos nerviosos después de la enfermedad sistémica. Dependiendo de la cepa viral, los signos pueden relacionarse con enfermedad aguda de la sustancia gris o con enfermedad subaguda o crónica de la sustancia blanca.

En la primera predominan ataques y mioclonías con hiperestesia y depresión; mientras que en la segunda las manifestaciones nerviosas son diversas y progresivas, e incluyen mioclonías, nistagmo, ataxia, déficit postural y tetraparesis o parálisis (Greene

and Appel, 1998; Vandeveldde and Zurbriggen, 2005). En ambas presentaciones pueden aparecer signos meníngicos de hiperestesia y rigidez cervical y en algunos animales, una mejoría en la respuesta inmune, reflejada especialmente en un incremento de anticuerpos neutralizantes, puede promover la recuperación.

En otros casos, tiene lugar una progresión retardada de la enfermedad con una respuesta inmune moderada y signos clínicos tempranos discretos. Más tarde como consecuencia de la persistencia viral en el SNC pueden aparecer disturbios manifiestos, expresión de la forma nerviosa del distemper canino. Estos animales usualmente mueren, pero algunos se recuperan y pueden mostrar signos residuales de por vida, tales como mioclonías.

En ocasiones, puede presentarse una encefalomiелitis crónica silenciosa sin manifestaciones extraneurales, apareciendo luego signos cerebelosos o vestibulares que progresan a tetraparesia o tetraplejía. Es de aparición frecuente una neuritis óptica y lesiones de retina (Amude *et al.*, 2006).

Se ha descrito una encefalitis posvacunal con signos nerviosos tales como cambios de comportamiento, convulsiones y ceguera alrededor de 1 a 2 semanas posteriores a la inmunización, con alta tasa de mortalidad (Higgins *et al.*, 1988).

2.2.7. Inmunidad protectora

Para la eliminación del VDC es crucial la participación tanto de la inmunidad humoral como de la mediada por células. Los anticuerpos IgM aparecen dentro de las dos semanas posinfección (Vandeveldde and Zurbriggen, 2005) y su magnitud se correlaciona con las consecuencias de la enfermedad.

En general, la inmunidad humoral protectora se debe a la producción de anticuerpos anti nucleoproteína viral, seguidos por la aparición de otros dirigidos a las proteínas de envoltura (Miele and Krakowka, 1983).

La eliminación del virus depende de inmunoglobulinas específicas para reconocer proteínas de la envoltura viral, especialmente anti proteína HN, las cuales previenen el

desarrollo de lesiones en el SNC. Por otra parte, la carencia de una respuesta inmune humoral efectiva conduce a un curso clínico agudo, a menudo fatal (Rima *et al.*, 1991).

Una pérdida temporaria de anticuerpos contra la proteína viral M, así como una respuesta retardada o disminuida de anticuerpos fijadores del complemento dirigidos a las proteínas de la envoltura viral, tienen como consecuencia la aparición de una enfermedad neurológica persistente (Miele and Krakowka, 1983).

Los anticuerpos neutralizantes y la citotoxicidad humoral mediada por complemento, representan factores críticos para la eliminación de partículas virales libres y para la predicción del resultado clínico. Sin embargo, la prolongada exposición a ellos, lleva a una internalización de los antígenos virales de superficie y a su desaparición subsecuente de la membrana de las células infectadas (Ho and Babiuk, 1980; Appel *et al.*, 1982, 1984).

Así, a pesar de una reducción de su diseminación, la modulación de la expresión de antígeno viral mediada por anticuerpos puede representar un factor que contribuya a la persistencia de la infección, debido posiblemente a la disminución del reconocimiento de antígenos e inadecuada citotoxicidad humoral mediada por complemento (Ho and Babiuk, 1979, 1980; Alldinger *et al.*, 1993).

Luego de la infección por el VDC puede detectarse una respuesta inmune humoral específica de por vida, mientras que la respuesta inmune celular se detecta solamente por un corto período de tiempo (Appel *et al.*, 1982). Sin embargo, su importancia es destacada, ya que se ha demostrado la existencia de inmunidad celular protectora, en ausencia de respuesta inmune humoral detectable (Gerber and Marron, 1976).

2.2.8. Diagnóstico clínico

El diagnóstico clínico se basa en la presencia de al menos tres de los signos que se mencionan a continuación: hipertermia (39,5 °C o más); secreción ocular y/o nasal; disnea; diarrea y/o vómitos; lesiones cutáneas; hiperqueratosis en almohadilla plantar y hocico; signos nerviosos compatibles y persistencia de la signología por más de tres semanas.

Aunque la enfermedad multisistémica es fácil de reconocer, no siempre se presenta de esa manera, existiendo incluso manifestaciones neurológicas no clásicas, que dificultan el diagnóstico.

2.2.9. Pruebas complementarias

Las principales pruebas complementarias para efectivizar el diagnóstico del distemper canino son:

- hematología: en casos agudos hay linfopenia y trombocitopenia, pudiendo estar aumentado el recuento de monocitos (Greene and Appel, 1998).
- radiología: una placa torácica muestra un patrón pulmonar intersticial en casos tempranos de moquillo. En infecciones bacterianas secundarias y bronconeumonías, se observa un patrón alveolar (Greene and Appel, 2006).
- análisis de LCR: es habitual que perros con compromiso nervioso tengan aumentada la concentración de proteínas y células mononucleares. También es posible hallar antígenos virales en células de LCR en casos agudos de encefalitis pero su ausencia no excluye la infección por el VDC. Mientras persista el virus en el SNC se puede demostrar interferón en el LCR. La presencia de anticuerpos contra el VDC en el LCR evidencia de manera definitiva encefalitis, pues los anticuerpos se producen en forma local y no en individuos enfermos que desarrollaron la forma sistémica sin compromiso neurológico (Greene and Appel, 1998). Después de la vacunación, los anticuerpos producidos tampoco pasan al LCR (Johnson *et al.*, 1988; Potgieter and Ajidagba, 1989).
- detección de anticuerpos neutralizantes, precipitantes o citotóxicos: estas pruebas no son de utilidad para el diagnóstico, ya que perros infectados en forma aguda pueden morir sin aparición de anticuerpos neutralizantes mientras que los infectados en forma subaguda o crónica pueden tener niveles de anticuerpos comparables con los vacunados.

2.2.10. Pruebas confirmatorias

A fin de confirmar el diagnóstico, las principales pruebas disponibles a tal fin son:

- inmunofluorescencia directa (IFD): permite detectar virus a partir de hisopados de conjuntiva, mucosa genital, tejidos, sangre, LCR u orina. Es imprescindible realizarla en la etapa aguda de la enfermedad.

- prueba de ELISA: es una prueba útil ya que la IgM en perros infectados persiste entre 5 semanas a 3 meses, dependiendo de la cepa y la respuesta del hospedador. En perros vacunados la IgM persiste por aproximadamente 3 semanas (Bernard *et al.*, 1982).
- inmunocitoquímica: permite detectar antígenos virales y/o cuerpos de inclusión en células blancas, improntas vaginales, prepuciales o conjuntivales, y de lavado bronquial, así como en sedimentos urinarios o LCR al inicio de la infección. En casos subagudos o crónicos estas pruebas pueden resultar negativas, aunque no se descarta la presencia del virus (Kristensen and Vandeveld, 1978).
- RT-PCR: puede confirmar infección al segundo día de ocurrida debido a su capacidad de amplificar fragmentos del ácido nucleico en forma exponencial, aun habiendo en la muestra una sola molécula.
- observación de partículas virales en materia fecal mediante microscopía electrónica.
- aislamiento e identificación viral: el virus puede ser aislado de las mismas muestras usadas para IFD.

2.2.11. Tratamiento

El distemper canino representa un reto para el clínico de pequeños animales debido a la carencia de terapéuticas específicas con fármacos antivíricos, y a la dificultad para formular un correcto pronóstico (Greene and Appel, 1998).

Al tratarse de una enfermedad viral que involucra diferentes órganos o sistemas, el tratamiento convencional es inespecífico y de sostén, por lo que debe adaptarse a cada caso particular. Básicamente deben controlarse las infecciones bacterianas secundarias, y tratar los signos clínicos observados. Lo empleado con mayor frecuencia consiste en:

- antibioticoterapia: los cuadros de neumonía a menudo se complican con infecciones bacterianas secundarias, causadas por *Bordetella bronchiseptica* entre otras, por lo que es necesario administrar antibióticos de amplio espectro, siendo de elección ampicilina o amoxicilina-clavulánica.

- fluidoterapia: debe ser suministrada a los animales en todos los casos, por la posible deshidratación ocasionada por los signos digestivos (vómitos, diarreas) o anorexia, la que se presenta en casi todos de los animales enfermos. Se deben administrar soluciones electrolíticas balanceadas por vía intravenosa.
- vitaminas: se pueden suministrar vitaminas del grupo B, para reemplazar las que se pierden a causa de la anorexia y la diuresis y debido a que estimulan el apetito. Se han mencionado beneficios en el uso del ácido ascórbico intravenoso, sin embargo aún no se ha corroborado su eficacia. Estudios controlados documentaron una disminución en la morbilidad y mortalidad en niños con sarampión que recibieron 2 dosis de 200.000 UI (60 mg) de vitamina A dentro de los 5 días de aparición de la enfermedad sistémica. A pesar de no estar comprobada su eficacia en moquillo, es factible indicar un tratamiento similar para cachorros con infección sistémica aguda (Greene and Appel, 2006).
- antipiréticos: su empleo está justificado en los cuadros febriles con temperaturas superiores a 40°C.
- medicación anticonvulsiva y sedante: el tratamiento de los trastornos neurológicos es menos gratificante, ya que la encefalitis multifocal es progresiva y conduce a tetraplejía e incapacitación, por lo que frecuentemente está indicada la eutanasia. El uso de anticonvulsivantes está recomendado después de iniciada la enfermedad sistémica y antes de que comiencen las crisis.
- antiinflamatorios esteroides: están indicados para controlar la neuritis óptica, sus secuelas de ceguera y para aliviar los signos de edema cerebral.
- interferencia con la replicación viral: con esta finalidad se ha preconizado la aplicación por vía intramuscular de vacunas de virus homólogo atenuado. En caninos de hasta ocho kg de peso se aplica una dosis, y en individuos que superan ese peso se aplica una dosis doble. Transcurridas 24 horas, se aplica a todos los animales, sin importar su peso una única dosis final (Greene and Appel, 1998).

En la **tabla 2** se presentan los datos posológicos de los principales medicamentos empleados en el tratamiento de sostén del cuadro clínico de distemper canino.

Fármaco	Dosis (mg/kg)	Vía de administración	Intervalo entre dosis (horas)	Duración del tratamiento (días)
Antimicrobianos				
Ampicilina, Amoxicilina	20	Oral, IV, SC	8	7
Doxiciclina	5-10	Oral, IV	12	7
Cloranfenicol	15-25	Oral, SC	8	7
Florfenicol	25-50	SC, IM	8	3-5
Cefapirina	10-30	IM, IV, SC	6-8	3-5
Anticonvulsivos				
Fenobarbital	2	Oral, IV, IM	12	según necesidad
Antiinflamatorios				
Dexametasona	1-2 ^(*) 0,1	IV Oral, IV, SC	24 24	1 3-5

^(*) Indicado en edema del SNC y neuritis óptica

Tabla 2. Terapéutica farmacológica de sostén para el distemper canino.

2.2.12. Terapéuticas alternativas

En los últimos años se han adoptado dos alternativas terapéuticas, consistentes en:

- estimular la respuesta inmune innata empleando agentes inmunomoduladores.
- emplear fármacos que limiten la acción del virus afectando su replicación.

2.2.12.1. Terapia con Inmunomoduladores: lipopolisacáridos y fracciones bacterianas

Los inmunomoduladores son sustancias con la propiedad de aumentar o disminuir la respuesta inmune. Esta capacidad de modulación tiene amplio potencial de uso en la terapia adyuvante de enfermedades infecciosas, neoplásicas, alérgicas e inmunodeficiencias.

En las enfermedades infecciosas, el creciente problema de la resistencia a los agentes antibióticos y quimioterápicos, hace notorio el impacto benéfico que puede tener la modulación de la respuesta inmune en la resolución de la enfermedad (García Hernández *et al.*, 2009).

El sistema inmune es el responsable de la defensa del organismo contra microorganismos patógenos y neoplasias. Su rol está basado en su capacidad para discriminar entre moléculas extrañas y componentes propios e identificar ligeras diferencias químicas que distinguen a un patógeno de otro. Posee además la facultad de generar una gran variedad de células y moléculas capacitadas para el reconocimiento de diversos agentes patógenos, y el posterior desarrollo de una respuesta efectora apropiada para eliminar o neutralizar a los mismos (Tizard, 2009).

Esta respuesta integra mecanismos propios de la inmunidad innata y de la adaptativa, los cuales difieren en varios aspectos. La primera actúa desde el comienzo, mientras que la segunda se manifiesta luego de varios días.

La inmunidad innata está constituida por varios componentes. Como primera defensa a la invasión de microorganismos se encuentran la piel y los epitelios de los aparatos respiratorio, digestivo y genitourinario. Éstos actúan como una barrera física, producen sustancias con actividad microbiostática y microbicida y además, presentan incluidas en su estructura células fagocíticas con capacidad de producir mediadores que inducen y orientan el curso de la respuesta inmune adaptativa.

El componente celular de la inmunidad innata reconoce a través de una amplia familia de receptores de reconocimiento de patrones (RRP), un número reducido de estructuras muy conservadas de los microorganismos, denominadas patrones moleculares asociados con patógenos (PMAP).

Otros componentes que constituyen la principal línea de defensa en el inicio de una infección viral, son los interferones de tipo 1 (IFN-1), las células asesinas naturales (NK) y las células dendríticas plasmocitoides (Janeway and Medzhitov, 2002).

La base de la inmunidad adaptativa la constituyen los linfocitos T y B los que son responsables de los atributos de diversidad, especificidad, memoria y reconocimiento de lo propio y de lo extraño. A diferencia de la respuesta inmune innata reconocen motivos particulares de los patógenos, representados por lo general por secuencias aminoacídicas cortas, empleando como sistema de reconocimiento un repertorio amplio y variado de receptores antigénicos distribuidos clonalmente en linfocitos T (RCT) y B (RCB).

Este repertorio se desarrolla durante un proceso denominado ontogenia y transcurre, para los linfocitos T, en el timo y para los linfocitos B en la bolsa Fabricio en el caso de las aves, o en la médula ósea y el bazo en los mamíferos. Los otros tipos de leucocitos juegan papeles importantes, fagocitando y destruyendo microorganismos, presentando antígenos y secretando citocinas (Sxhwartz, 2003).

El proceso comienza con la captura de antígenos en los tejidos periféricos por parte de las células dendríticas, las que lo procesan y en respuesta a señales de estrés celular, migran hacia los órganos linfáticos secundarios donde los presentan a los linfocitos T, desencadenando la respuesta inmune adaptativa.

Según las señales que haya recibido la célula dendrítica en la periferia podrá activar a los linfocitos T en perfiles funcionales diferentes, aptos para combatir patógenos extracelulares o intracelulares o, alternativamente, mediar una función supresora.

Los linfocitos vírgenes buscan los antígenos en regiones especializadas de los órganos linfáticos secundarios, hacia donde drenan después de haber superado las barreras naturales del organismo. Al reconocer a su antígeno se activan y experimentan una expansión clonal. Una fracción mayoritaria del clon mediará funciones efectoras y una menor se diferenciará en células de memoria.

Presentan notables diferencias en el modo de reconocer los antígenos, así los linfocitos B los reconocen en su conformación nativa y se especializan en una única función, la producción de anticuerpos, que llevan a cabo una vez que se han diferenciado en plasmocitos. Por el contrario, los linfocitos T requieren la participación de células presentadoras de antígenos (CPA), a través de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad expresadas sobre su superficie, presentando diferentes perfiles fenotípicos y funcionales. En función de la expresión de las moléculas CD4 y CD8, se distinguen dos subpoblaciones: T CD4⁺ y T CD8⁺.

Los linfocitos T CD4⁺ no constituyen una población homogénea. De acuerdo con su perfil funcional, determinado fundamentalmente por el particular patrón de citocinas producido, se diferencian en tres grupos: Th₁, Th₂ y T regulador (T_R). No provienen de linajes diferentes de células T CD4⁺, pues la presencia de IL-12 y citocinas relacionadas, son las que promueven su diferenciación en un perfil Th₁, mientras que la presencia de IL-4 lo hace en uno Th₂.

Las células Th₁ median la activación de los macrófagos y contribuyen, además, a la activación y expansión de linfocitos T CD8⁺ citotóxicos, mientras que las células Th₂

colaboran con los linfocitos B y permiten su correcta activación, expansión y diferenciación a plasmocitos productores de anticuerpos.

Los antígenos intracelulares favorecen la respuesta Th₁, mientras que los extracelulares y solubles favorecen la Th₂. Las razones por las que la estimulación deriva hacia una u otra no son conocidas con precisión, pero están influenciadas por factores tales como el tipo de citocinas involucrado, las características de la infección, las CPA y otras células implicadas en la respuesta inmune (Nefjees, 1993).

Debido a que la búsqueda de agentes quimioterapéuticos seguros y efectivos ha sido entorpecida por la resistencia antimicrobiana y el riesgo de toxicidad, surgió la necesidad de entender cómo el sistema inmune puede ser manipulado para controlar las infecciones, lo que ha dado como resultado una diversidad de posibles fármacos moduladores, que incluyen tanto agentes inmunoestimulantes como inmunosupresores.

En algunos casos y dependiendo de la enfermedad, la finalidad de la modulación será aumentar la intensidad de la respuesta inmune disminuida por alguna causa (estrés o infecciones crónicas), mientras que en otros casos se tratará de reducirla cuando se encuentre fuera de regulación o control (enfermedades autoinmunes, transplantes o hipersensibilidad).

En la terapia de las enfermedades infecciosas, el objetivo se centra en la activación del sistema inmune mediante el uso de moduladores con efecto estimulador, ya que el restaurar una respuesta inmune disminuida o la potenciación de una respuesta normal, puede incrementar la resistencia a la infección, reducir la gravedad de la misma o acortar su periodo de recuperación (Sajid *et al.*; 2006).

La modulación de la respuesta inmune puede ocurrir por mecanismos directos o indirectos. Los mecanismos directos involucran la interacción de un inmunomodulador y/o su metabolito con un componente de las células del sistema inmune. De esta manera, el estímulo induce directamente una modificación en sus funciones (Martinez-Manrique, 2005).

Por su parte, los mecanismos indirectos involucran la interacción del inmunomodulador y/o su metabolito con un componente que no pertenece a las células efectoras del sistema inmunológico. Esta interacción con dicho componente, estimula o inhibe la liberación de un mensajero biológico que posee una actividad inmunomoduladora. Por lo tanto, los mecanismos directos son mensurables tanto *in vivo* como *in vitro*, mientras que los indirectos lo son solamente *in vivo* (Sander *et al.*, 1991).

El modo de acción de muchos inmunomoduladores no es del todo conocido, aun cuando en general sus principales células blanco son los linfocitos T y B, monocitos/macrófagos, granulocitos y células NK (Masihi, 2001).

Se han propuesto diversas hipótesis que podrían explicar la acción de algunas de estas sustancias. Muchos de los mecanismos de acción de los inmunomoduladores están basados en la alteración que producen en la actividad de las células inmunes tales como cambios en la expresión de genes, procesamiento del ARNm, transporte intracelular de proteínas, síntesis proteica y la secreción y expresión de proteínas en su superficie, lo cual produce cambios celulares que pueden influir en la inducción, mantenimiento y regulación de la respuesta inmune (Quinn, 1990).

En muchos casos, se ha observado que la acción de los inmunomoduladores está relacionada con el mecanismo y el equilibrio de segundos mensajeros que participan en las rutas de transducción de las señales celulares, como la adenosina-monofosfato cíclico (AMPc) y la guanina-monofosfato cíclico (GMPc). Por ejemplo, se ha demostrado que el aumento de los niveles de AMPc inhibe la función efectora de los linfocitos, lo que conduce a inmunosupresión, mientras que niveles altos de GMPc promueven un incremento de la actividad de los linfocitos maduros lo que se traduce en inmunoestimulación (Quinn, 1990; Reddy, 1990).

Uno de los componentes bacterianos que actúan como inmunoestimulantes son los LPS_B, constituyentes característicos de la pared celular de las bacterias gramnegativas (Jacobs, 1981; Mulcahy and Quinn, 1986; Sunwo *et al.*, 1996).

El LPS_B contiene una fracción llamada lípido A integrada por ácidos grasos unidos por enlaces estéricos a moléculas de N-acetilglucosamina. Otra fracción es la región R

compuesta de hexosas y una tercera fracción es el denominado antígeno O específico para cada especie bacteriana.

La actividad adyuvante de los LPS_B fue descrita por primera vez por Johnson y colaboradores en 1956. La mayoría de los estudios reportan que activan directamente a los macrófagos y su propiedad adyuvante puede deberse a su habilidad para estimular la producción y liberación de citocinas como la IL-1 (Warren *et al.*, 1986).

Los LPS_B tienen efectos directos sobre los linfocitos; son mitógenos de células B con lo cual generan un incremento en la producción de inmunoglobulinas. Estos polímeros complejos tienen sitios de unión para anticuerpos y otros componentes séricos, estando involucrados en el reconocimiento y eliminación de bacterias, estimulando además la producción de interferón y activando las vías clásica y alterna del complemento.

Diversos autores han comprobado los efectos que los LPS_B producen sobre el sistema inmunitario de los animales (Jacobs, 1981; Charley, 1986; Mulcahy and Quinn, 1986; Marshall and Zielger, 1989; Pang *et al.*, 1994; Norimatsu *et al.*, 1995; Singh *et al.*, 2000).

En medicina humana se ha utilizado el lípido A como adyuvante para incrementar la respuesta inmune frente a la toxina del cólera, *Herpes simplex*, virus de Epstein Barr, *Plasmodium falciparum* y *Neisseria meningitidis* (Verma *et al.*, 1992; Alving, 1993).

Otros compuestos que han sido utilizados como inmunomoduladores son las fracciones ribosomales de cepas bacterianas no patógenas, las que favorecerían el proceso de adhesión celular, modulando la expresión de moléculas en el endotelio de los vasos sanguíneos, y favoreciendo que los neutrófilos abandonen la circulación y migren hacia el lugar de la infección, sitio donde realizan su actividad fagocítica, sintetizan y liberan citoquinas inmunoreguladoras como IL1, IL3, IL8 e INF- α , las cuales pueden propiciar la evolución favorable de los procesos inmunes.

En la **Figura 3** se presenta un esquema con el mecanismo de acción de los LPS_B de una cepa bacteriana no patógena de *Escherichia coli* (Tizard, 2009).

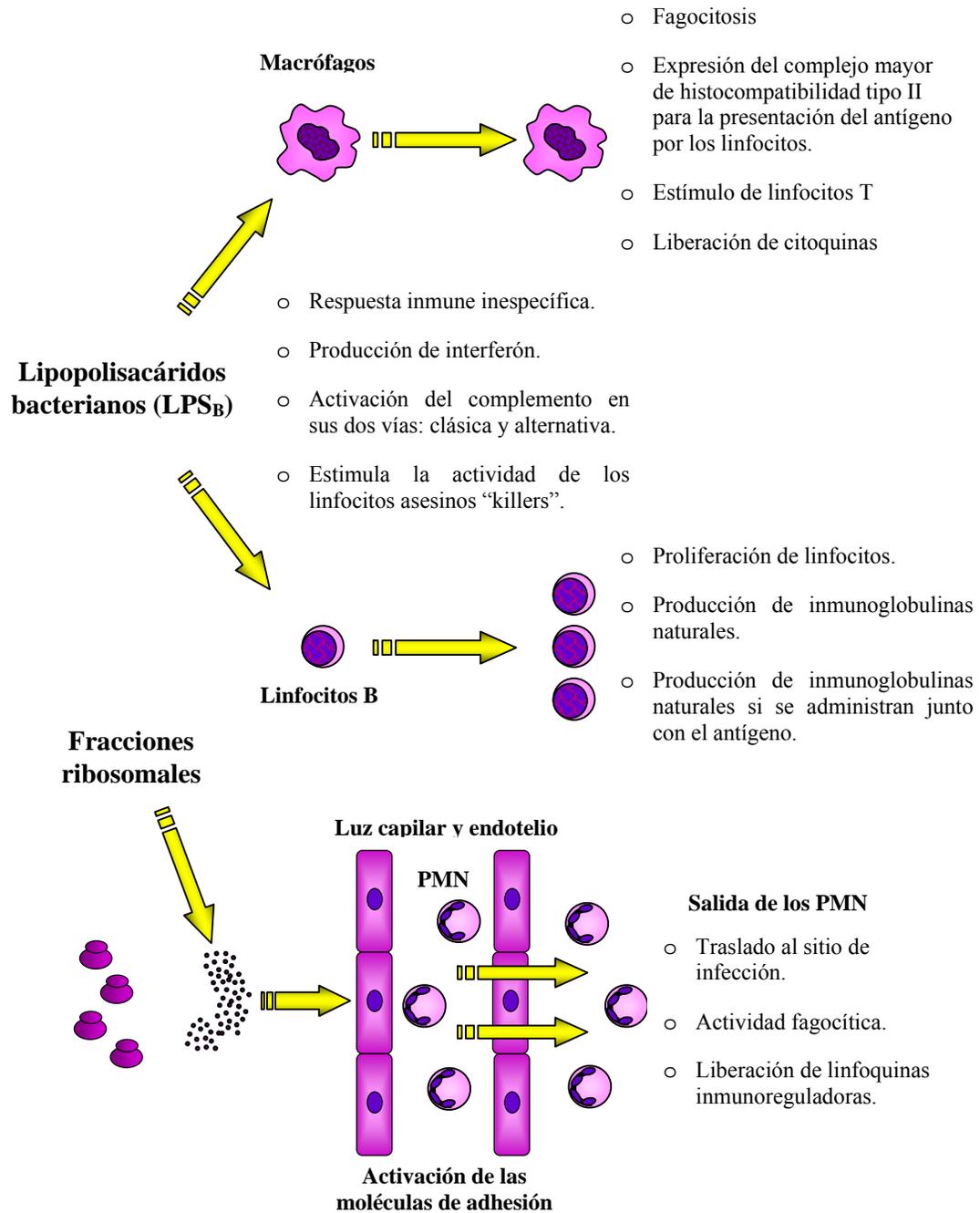


Figura 3. Representación esquemática del mecanismo de acción y vías de estimulación del sistema inmune por lipopolisacáridos y fracciones membranas y ribosomales de una cepa bacteriana no patógena de *Escherichia coli*.

Existen preparados comerciales con estos principios activos, uno de ellos es el Ribozim[®]-RN 205. Esta formulación está constituida por liposomas que contienen LPS_B y fracciones membranosas y ribosomales de una cepa no patógena de *Escherichia coli*, junto con agentes de formulación que aseguran el incremento del efecto terapéutico, la reducción de la toxicidad y la protección de las sustancias activas sensibles.

En general están indicados para potenciar la respuesta del sistema inmune, como terapia de apoyo en enfermedades virales o bacterianas, en el tratamiento de afecciones que deprimen el sistema inmunitario y como terapia antiestrés. No se dispone de reportes de ensayos clínicos que avalen científicamente la eficacia del empleo de LPS_B como coadyuvante en la terapéutica del distemper canino.

2.2.12.2. Azatioprina

En el caso de los fármacos inmunosupresores, nos ocuparemos de la AZP, prescrita por algunos profesionales como terapia alternativa para el distemper canino. Pertenece al grupo de las tiopurinas, junto a la 6-mercaptopurina (6-MP) y a la 6-tioguanina (6-TG). La AZP y la 6-MP son análogos de las purinas, que actúan como antagonistas de las de origen endógeno, constituyentes esenciales del ADN, ARN y varias coenzimas (Sahasranaman *et al.*, 2008).

La AZP, cuyo nombre químico es 6-(3-methyl-5-nitro-imidazol-4-yl) sulfanyl-7H-purina (C₉H₇N₇O₂S) tiene un peso molecular de 277,264 g/mol. Es insoluble en agua, pero puede disolverse con la adición de un equivalente molar de álcali.

La sal de sodio de la AZP en cambio es suficientemente soluble como para preparar una solución en agua de 10 mg/mL, que es estable durante 24 horas a 15-25°C. La AZP es estable en solución a pH neutro o ácido, pero se produce la hidrólisis a 6-MP en exceso de hidróxido de sodio (0,1 N), especialmente por calentamiento.

La conversión a 6-MP también se produce en presencia de compuestos sulfhidrilos, tales como cisteína, glutatión, y sulfuro de hidrógeno. La fórmula estructural y tridimensional de la AZP se presenta en la **Figura 4**.

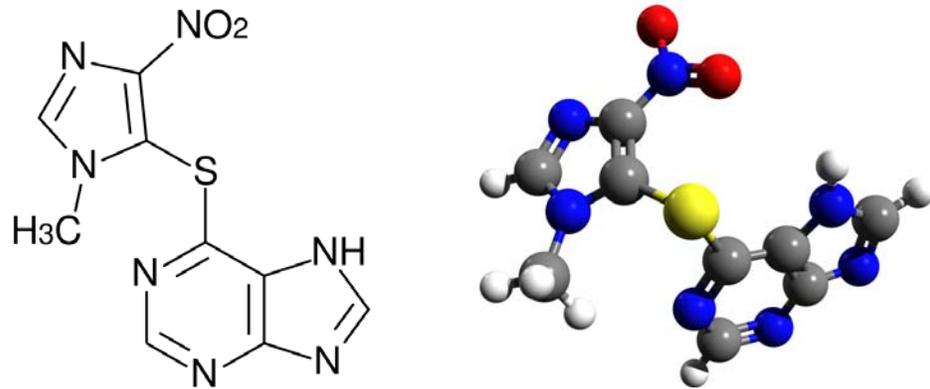


Figura 4. Fórmula estructural y tridimensional de AZP.

A partir del año 1950 la AZP y su metabolito la 6-MP, fueron empleados para el tratamiento de leucemia y en el año 1960, ambos compuestos comenzaron a utilizarse como agentes inmunosupresores para evitar el rechazo de injertos en los trasplantes de órganos (Remuzzi *et al.*, 2004, Woodroffe *et al.*, 2005).

El primer antecedente del empleo de la AZP para el tratamiento de una enfermedad inflamatoria intestinal data del año 1962, cuando se reporta el éxito de su utilización en la colitis ulcerativa (Bean, 1962; Present *et al.*, 1980; Kornbluth and Sachar, 1997; Derijks *et al.*, 2006; Teml *et al.*, 2007) y en la enfermedad de Crohn (Hanauer and Sandborn, 2001).

La AZP fue desarrollada para enlentecer la inactivación enzimática de la 6-MP, en consecuencia, la AZP se comporta como un agente inmunosupresor más potente que la 6-MP.

Después de exponerse a nucleófilos como el glutatión, esta se desdobra hasta la forma de 6-MP, la cual a su vez se convierte en más metabolitos, uno de los cuales la 6-tioinosina monofosfato (6-Tio MP), quién inhibe el primer paso de la nueva síntesis de las bases purínicas (Tay *et al.*, 1969; Allan and Bennett, 1971).

Tras una serie de reacciones enzimáticas, la 6-Tio MP es transformada en 6-tioguanosina monofosfato (6-Tio GMP), y por último en 6-tioguanosina trifosfato (6-Tio GTP), que se incorpora al ADN (Swann *et al.*, 1996). En consecuencia, la actividad de los productos derivados de la AZP interfieren en la síntesis de ARN y del ADN, afectando

negativamente el proceso de proliferación celular e inhibiendo con ello las funciones de los linfocitos (Lennard, 1992).

El principal efecto de esta droga es la reducción en el número de linfocitos y la inhibición de la síntesis de anticuerpos dependientes de linfocitos T. La AZP es usada en combinación con glucocorticoides, con los cuales presenta actividad sinérgica.

La rapidez con la que se produce el efecto inmunosupresor es variable. Se ha documentado que la reducción en el número de linfocitos T ocurre a los 7 días (Ogilvie *et al.*, 1988), aunque otros autores sugieren la existencia de un período de latencia de 3 a 5 semanas (Beale, 1988).

La AZP se absorbe rápidamente en el tracto gastrointestinal, presentando una biodisponibilidad biológica de aproximadamente el 60% y alcanzando su máxima concentración plasmática luego de transcurridas una a dos horas de su administración oral (Lin *et al.*, 1980).

Una vez alcanzada la circulación general se une en forma moderada a las proteínas plasmáticas (30%). Su volumen de distribución es de $0,81 \pm 0,65$ L/kg, lo cual indica que la misma abandona el espacio vascular para difundir a los tejidos (Dollery, 1991) aunque en menor medida al tejido cerebral, atraviesa placenta y no se dispone de datos acerca de su eliminación vía leche materna (Briggs *et al.*, 1990).

Los niveles plasmáticos de la AZP y sus metabolitos son bajos (<1 $\mu\text{g/mL}$). No obstante, esta baja concentración hemática carece de valor predictivo respecto de su eficacia, dado que la magnitud y la duración de su efecto se correlacionan con la presencia de sus metabolitos activos y con los niveles de nucleótidos tiopurina que, como consecuencia, estarán presentes en los tejidos.

La AZP es rápidamente metabolizada en hígado y otros tejidos a 6-MP por acción de las enzimas xantina oxidasa y tiopurina metiltransferasa (TPMT). Los metabolitos se excretan por orina, donde pueden detectarse cantidades muy pequeñas de AZP y 6-MP (McEvoy, 1993). La AZP presenta una corta semivida ($0,16 \pm 0,07$ horas), aunque muchos

de sus metabolitos presentan semividas de eliminación de hasta cinco horas (Lin *et al.*, 1980).

Los principales efectos tóxicos de la AZP consisten en mielosupresión, pancreatitis aguda, hepatopatías y desórdenes gastrointestinales (Beale, 1988; Houston and Taylor, 1991; Rinkardt and Kruth, 1996; Kid *et al.*, 2004).

Si bien la AZP está clasificada como fármaco citotóxico, en medicina humana es empleada para prevenir el rechazo de injertos en trasplantes de órganos y en el tratamiento de enfermedades autoinmunes, tales como artritis reumatoidea, esclerosis múltiple, hepatitis autoinmune, dermatitis atópica, miastenia gravis, neuromielitis óptica y las mencionadas colitis ulcerativa y enfermedad de Crohn (Hanauer and Sandborn, 2001).

En la práctica clínica de pequeños animales, se la emplea casi exclusivamente en el manejo de enfermedades inmunomediadas en perros y en menor medida en gatos. Su utilización junto a corticoesteroides potencia su efecto y también el riesgo de mayor toxicidad.

Se ha demostrado *in vitro* que la AZP presenta actividad antivírica sobre el virus de la diarrea viral bovina, y propuesto como responsables a ciertos metabolitos (Hoover and Striker, 2006). Para el virus de la hepatitis C, se reportó un efecto similar (Stangl *et al.*, 2004).

La actividad antiviral se realiza presumiblemente de dos maneras. Una de ellas postula que los metabolitos resultantes de los procesos enzimáticos a que es sometida la molécula de AZP, entre ellos la 6-MP, inhiben la síntesis de purina. La otra, supone que la 6-TG incorporándose al ADN del genoma celular, presenta efectos antivíricos.

Esto se explica por el hecho que al interferir con la síntesis de ARN y de ADN, se impide al virus utilizar los mecanismos celulares para replicarse (Ling *et al.*, 1992; Vogt *et al.*, 1993; Coulthard *et al.*, 2002).

No obstante, las concentraciones necesarias para alcanzar estos efectos son sumamente elevadas como para poder ser empleadas *in vivo*, desconociéndose su impacto en cuanto al riesgo de aparición de infecciones debidas a la inmunosupresión.

Su empleo en el tratamiento del distemper canino ha sido justificado argumentando que el virus, durante su fase de replicación, incorpora más análogos de bases purínicas que las células del hospedador y por lo tanto sería mucho más afectado que éstas (Aixelá, 2001).

La teoría propuesta por Aixelá, solo es avalada por su experiencia profesional y no está fundamentada en un ensayo clínico que incluyendo a un grupo control, permita corroborar la eficacia de la terapéutica de AZP, ni la conveniencia de su utilización en el tratamiento del distemper canino.

No obstante, las propiedades farmacológicas de la AZP enunciadas y su supuesta ventaja terapéutica tienen gran impacto en la opinión de muchos clínicos de la especialidad, al punto que actualmente existe en el mercado farmacéutico veterinario una formulación comercial de AZP (Azatioprina J'anvier[®], Laboratorios J'anvier), que preconiza su empleo en el tratamiento del distemper canino, indicación que es justificada citando el trabajo reportado por Aixelá (2001).

Materiales y Métodos

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Definición de unidad de muestreo y de trabajo

Tanto las unidades de muestreo como las de trabajo fueron caninos afectados de distemper residentes en la ciudad de Santa Fe y/o área de influencia durante los años 1998 y 2009.

3.2. Criterios de inclusión

Los animales que se incluyeron en el proyecto fueron caninos mayores a dos meses de edad de ambos sexos, de cualquier raza o mestizos, con diagnóstico de distemper realizado por signología clínica, y confirmado por IFD.

Criterios clínicos empleados para el diagnóstico:

- hipertermia (39,5°C ó más).
- secreción ocular y/o nasal.
- disnea.
- anorexia.
- diarrea y/o vómitos.
- lesiones cutáneas compatibles.
- hiperqueratosis en hocico y/o almohadilla plantar.

El diagnóstico clínico fue confirmado por IFD sobre células conjuntivales, gingivales, prepuciales o vaginales con suero policlonal comercial conjugado con isotiacianato de fluoresceína, siguiendo el método descrito por el fabricante (VMRD-catálogo 210-02 CDV).

Las células del epitelio conjuntival, gingival, prepucial o vaginal se tomaron frotando la mucosa con hisopos de algodón, según técnica. Se realizaron no menos de tres improntas por paciente, mediante “toques”, teniendo la precaución de no extender los mismos.

3.3. Criterios de exclusión

Quedaron excluidos del ensayo: los caninos menores a dos meses de edad, los que habían sido vacunados en el último año, aquellos que presentaron signos nerviosos a su

ingreso o que padecían otro cuadro clínico y/o estaban recibiendo algún tratamiento farmacológico.

3.4. Relevamiento epidemiológico

Se realizó mediante la recolección de datos clínicos de los caninos con diagnóstico de distemper. De cada paciente que cumplió con los criterios de inclusión, el profesional actuante completó una ficha en la cual se registraron los siguientes datos:

- profesional actuante.
- fecha del inicio de la observación.
- fecha del final de la observación.
- edad del paciente.
- raza.
- sexo.
- tamaño (chico: hasta 10 kg; mediano: desde 10 a 25 kg; grande: mayor a 25 kg)
- propietario, domicilio y teléfono.
- tratamiento realizado: de sostén, de sostén más LPS_B o de sostén más AZP.

A fin de disponer de valores de referencia de la frecuencia de distribución de la talla de los caninos en la ciudad de Santa Fe y zona de influencia, se obtuvieron datos a partir de fichas seleccionadas al azar de pacientes atendidos en la clínica del autor en la ciudad de Santa Fe durante el período comprendido entre los años 1998 y 2009.

Los datos de temperatura y humedad relativa ambiente de la ciudad de Santa Fe durante el período de estudio se obtuvieron del sitio web: tutiempo net.; <http://www.tutiempo.net/tiempo/Argentina/AR.html>

Los datos de referencia de presentación clínica mensual en relación a la temperatura y la humedad relativa ambiente se obtuvieron del trabajo realizado por Headley y Graça (2000); en tanto que la información de referencia acerca de la distribución de edades y sexo de caninos en una población se obtuvo de los estudios efectuados por Morales y colaboradores (1997) y Headley y Graça (2000).

3.5. Estudio epidemiológico

En base a los datos obtenidos se determinó:

- frecuencia de aparición de cada signo clínico.
- frecuencia de presentación mensual, estacional y anual de la enfermedad.
- frecuencia de casos en relación a la temperatura y a la humedad relativa ambiente promedio mensual.
- frecuencia de presentación según sexo, tamaño y edad.

3.6. Estudio de eficacia terapéutica

3.6.1. Tamaño de la muestra, grupos experimentales y tratamiento

El tamaño de la muestra estuvo conformado por 131 caninos con diagnóstico de distemper, con los cuales se constituyeron tres grupos: A, B y C:

- el grupo A estuvo compuesto por 57 animales a los cuales se les aplicó terapéutica de sostén consistente en antibióticos de amplio espectro, soluciones electrolíticas, vitaminas y antieméticos según criterio profesional.
- el grupo B estuvo conformado por 48 animales que fueron tratados con el tratamiento de sostén más LPS_B (Ribozim[®]) administrado en a la dosis de 1 ml/10 kg de peso vivo repetida a las 48 horas.
- el grupo C estuvo integrado por 26 animales que recibieron el tratamiento de sostén más AZP (Azatioprina Janvier[®]) administrada a la dosis de 1 mg/kg/día durante diez días consecutivos.

3.6.2. Parámetros para evaluar la eficacia terapéutica

La eficacia terapéutica se evaluó como un parámetro de distribución binomial para cada individuo:

- favorable (+), en caso de remisión del cuadro clínico.
- desfavorable (-), en caso de aparición de signos nerviosos o muerte.

3.6.3. Control de la evolución clínica de los animales

El control de la evolución de los animales durante la implementación de cada uno de los esquemas terapéuticos, se realizó mediante el registro sistemático de las observaciones clínicas realizadas a lo largo de toda la duración de los mismos. Los datos registrados consistieron en:

- fecha de realización de las consultas.
- registro semanal de los signos clínicos más relevantes: hipertermia, secreción ocular, blefaritis, secreción nasal, disnea, disminución del apetito, vómitos, diarrea, lesiones cutáneas, hiperqueratosis del hocico y/o almohadilla plantar y signología nerviosa. Cada uno de estos signos clínicos se calificó como ausente, leve, moderado o severo.
- remisión o aparición de nuevos signos clínicos.
- fin del seguimiento, registrando el alta del paciente en caso de una evolución favorable o en el caso de una evolución desfavorable la fecha del deceso o aparición de signología nerviosa.

3.7. Estudio estadístico

Se utilizó el Software InfoStat (2008), *InfoStat versión 2008*. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.

Los datos experimentales se presentaron como promedio y desvío estándar (DE). La determinación de diferencias entre grupos se realizó empleando el análisis de varianza (ANOVA) de una vía.

El tratamiento estadístico se llevó a cabo mediante los siguientes pasos:

- comprobación de la distribución normal de los datos experimentales empleando el test de Kolmogorov-Smirnov.
- verificación de la homocedasticidad de la varianza mediante el test de Bartlett.
- comparación de los grupos experimentales utilizando el test de ANOVA de una vía.
- en los casos en que se detectaron diferencias, se compararon los grupos entre sí con el test de Tukey-Kramer.
- los grupos que no mostraron homocedasticidad de varianza (heterocedasticidad) se compararon mediante el test de Kruskal-Wallis (ANOVA no-paramétrico).
- al detectar diferencias, se compararon los grupos entre sí aplicando el test de Dunn.
- el límite de significancia fue fijado en 5% ($p = 0,05$).

La comparación de distribución de frecuencias entre los datos experimentales se analizó con el test de χ^2 con el límite de significancia fijado en 5% ($p = 0,05$).

Resultados y Discusión

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Frecuencia de signos clínicos de distemper canino

Cada signo clínico considerado en sí mismo es inespecífico, pero la presencia conjunta de varios de ellos en un animal constituye una buena evidencia diagnóstica.

La bibliografía es concordante en cuanto a la importancia de la detección de varios signos simultáneos para fundar un diagnóstico en ausencia de pruebas complementarias, pero no especifica cuáles de ellos son los más constantes. Es de mencionar que un diagnóstico clínico correcto y precoz es importante, debido a que la IFD u otras pruebas confiables de laboratorio no se encuentran disponibles de modo práctico en el ejercicio diario de la profesión.

A fines de analizar su frecuencia, y en base a la experiencia de muchos años como clínico de la especialidad, he especificado 10 signos corrientemente detectados como orientadores del diagnóstico (**Tabla 3 y Figura 5**).

Signos Clínicos	n	%
Hiperqueratosis de la almohadilla plantar	3	2,29
Vómitos	69	52,67
Diarrea	78	59,54
Lesiones cutáneas	96	73,28
Disnea	111	84,73
Secreción nasal	116	88,55
Blefaritis	116	88,55
Anorexia	126	96,18
Secreción ocular	128	97,71
Hipertermia	131	100,00

Tabla 3. Frecuencia de presentación de signos clínicos de 131 casos de distemper canino diagnosticados en la ciudad de Santa Fe y zona de influencia entre los años 1998 y 2009. Los datos se presentan como número de casos y como porcentaje del total de individuos diagnosticados.

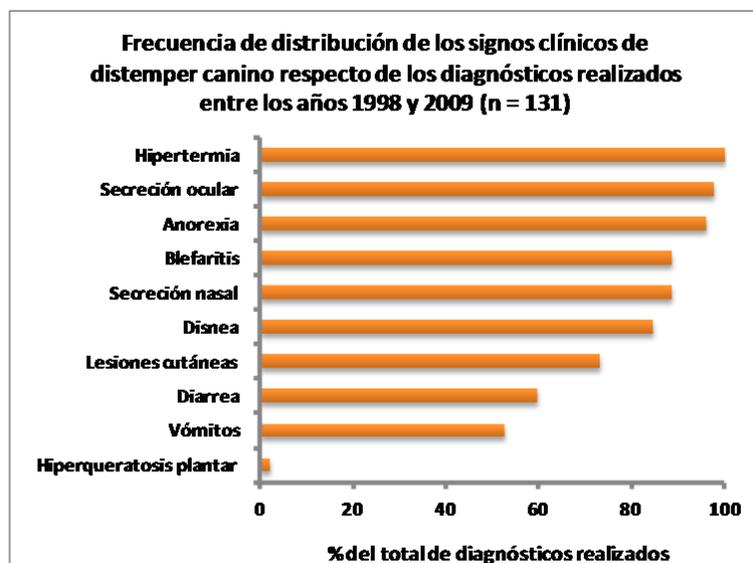


Figura 5. Frecuencia de presentación de signos clínicos iniciales de 131 casos de distemper canino diagnosticados en la ciudad de Santa Fe y zona de influencia entre los años 1998 y 2009. Los datos se presentan como porcentaje del total de individuos diagnosticados.

El único signo clínico de presencia en el 100% de los caninos examinados fue la hipertermia ($\geq 39,5^{\circ}\text{C}$), mientras que la anorexia y la secreción ocular se presentaron en un 96,18% a 97,71% respectivamente. Es de destacar también la alta frecuencia de signos respiratorios (disnea 84,73% y secreción nasal 88,55%), superior a los digestivos, igualmente de alta frecuencia (vómitos 52,67% y diarrea 59,54%).

En cuanto a las manifestaciones cutáneas, la proporción de ciertas lesiones como pústulas fue del 73,28%, mientras que la hiperqueratosis de la almohadilla plantar fue de baja presentación (2,29%).

La ausencia de registros de signos nerviosos iniciales se debe a que los caninos que presentaron los mismos a la primera consulta se consideraron individuos que ya habían evolucionado en forma desfavorable y por lo tanto no cumplían con el criterio de inclusión.

No obstante, en el seguimiento semanal observamos que 27 caninos (20,61%) desarrollaron signos nerviosos de diversa intensidad, porcentaje que puede considerarse como un buen estimador poblacional, ya que en la mayoría de los casos clínicos, los fenómenos neurológicos se manifiestan durante el transcurso de la enfermedad y no están

presentes al inicio de la misma (Beineke *et al*, 2009). Es de destacar que en solo 2 animales (1,52%) se produjo la muerte en ausencia de signos nerviosos.

No hemos hallado en la literatura ninguna publicación de trabajos realizados con la misma metodología y apuntando a objetivos similares, por lo que no nos fue posible comparar nuestros resultados con los obtenidos por otros autores.

Puede concluirse que, al menos en nuestra región, la presencia de hipertermia, anorexia, secreciones oculares, signos respiratorios son observados en forma conjunta en más del 80% de los casos.

4.2. Frecuencia de presentación clínica según: año, mes y estación climática

4.2.1. Frecuencia de presentación según año

El relevamiento comprendió un período que va desde el año 1998 al 2009, pero a los fines de comparar los datos en función de su distribución anual, tomaremos solo lo acontecido entre los años 1998 y 2004 inclusive (122 casos), ya que a partir de esa fecha no se registró la totalidad de los pacientes ingresados, relevando solo algunos casos en forma discontinua en función ciertas limitantes (presupuestarias y de colaboradores entre otras), por lo que el hecho de la sensible baja en la frecuencia observada en el período comprendido entre los años 2005 y 2009, presentó un importante sesgo y no reflejó la realidad. Los resultados se presentan resumidos en la **Tabla 4** y se hallan representados gráficamente en la **Figura 6**.

Año	n	%
1998	12	9,84
1999	40	32,79
2000	19	15,57
2001	17	13,93
2002	10	8,20
2003	7	5,74
2004	17	13,93
Total	122	100,0

Tabla 4. Frecuencia de presentación de 122 casos de distemper canino diagnosticados en la ciudad de Santa Fe y zona de influencia entre los años 1998 y 2004. Los datos se presentan como número de casos anuales y como porcentaje del total de individuos diagnosticados.

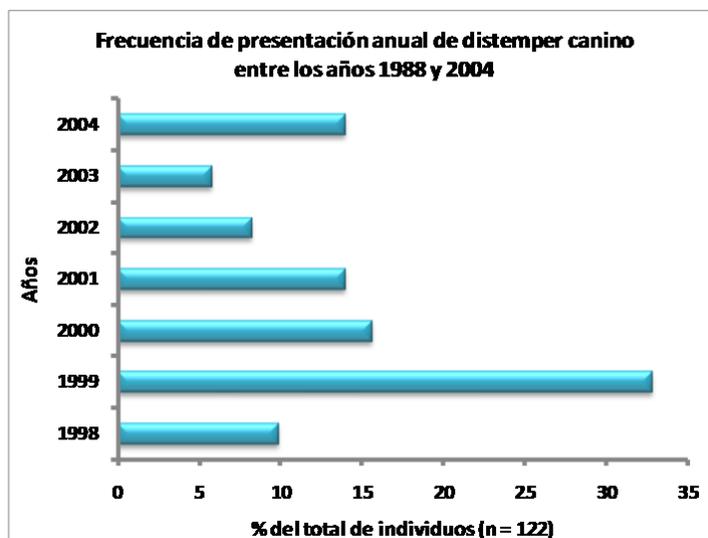


Figura 6. Frecuencia de presentación anual de 122 casos de distemper canino diagnosticados en la ciudad de Santa Fe y zona de influencia entre los años 1998 y 2004. Los datos se presentan como porcentaje del total de individuos diagnosticados.

Estos resultados evidencian una sensible baja en la casuística durante los años 2002 (8,20%) y 2003 (5,74%), fenómeno que podría atribuirse a la crisis económica de ese período. En el año 1999 se registró un elevado porcentaje (32,79%) que interpretamos en función de la dinámica de una típica enfermedad infectocontagiosa en la que periódicamente se presentan picos. No se avanzó a fin de establecer si ello se debió a algún cambio en la cepa viral circulante o a un aumento de la población susceptible.

4.2.2. Frecuencia de presentación según mes

Los resultados se presentan resumidos en la **Tabla 5** y se hallan representados gráficamente en la **Figura 7**.

Puede observarse un incremento importante de casos a partir de junio (9,02%), alcanzando el máximo valor en noviembre (22,95%), hecho que podría estar relacionado con la dinámica de la población susceptible.

Un punto de referencia para el análisis de las razones por las cuales la distribución mensual de casos permanece con escasa variación a través de los años, lo constituye la opinión de muchos profesionales, quienes sostienen que el número de nacimientos de cachorros es mayor en primavera, lo cual acumularía al final de esa estación, mayor cantidad de animales susceptibles a ciertas enfermedades, entre ellas el distemper canino.

Mes	n	%
diciembre	4	3,28
noviembre	28	22,95
octubre	14	11,48
septiembre	12	9,84
agosto	18	14,75
julio	10	8,20
junio	11	9,02
mayo	5	4,10
abril	6	4,92
marzo	6	4,92
febrero	5	4,10
enero	3	2,46
Total	122	100,0

Tabla 5. Frecuencia de presentación mensual de 122 casos de distemper canino diagnosticados en la ciudad de Santa Fe y zona de influencia entre 1998 y 2004. Los datos se presentan como número de casos mensuales y como porcentaje del total de individuos diagnosticados.

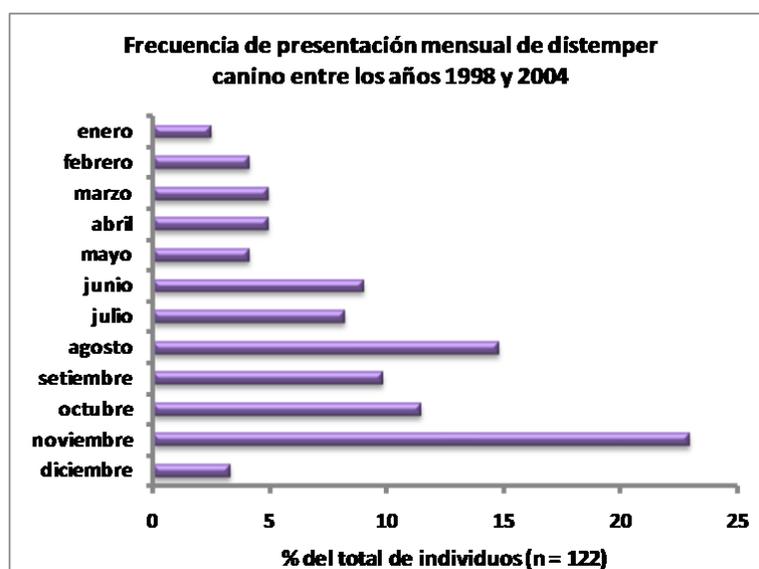


Figura 7. Frecuencia de presentación mensual de 122 casos de distemper canino diagnosticados en la ciudad de Santa Fe y zona de influencia entre los años 1998 y 2004. Los datos se presentan como porcentaje del total de individuos diagnosticados.

En un intento de corroborar o refutar esa creencia, se revisó el registro de ingresos de cachorros a nuestra clínica, y se lo utilizó como estimador de las fechas de nacimientos. Para ello se consideraron 522 fichas extraídas al azar, correspondientes a caninos menores a los tres meses de edad que habían concurrido a recibir su primera vacuna del plan de profilaxis.

Esta selección permitió eliminar o al menos minimizar errores en la determinación de las edades, así como el sesgo que representaría la ocasional aparición de alguna epidemia, con mayor flujo de caninos jóvenes en el mes en que ello ocurra.

Los datos obtenidos se pueden observar en la **Tabla 6** y en la **Figura 8**, en las cuales se puede apreciar que no hay un período del año en el que los nacimientos se incrementen de forma notoria y expliquen *per se* un aumento de la población susceptible.

Orden	Mes	n	%
1	enero	33	6,32
2	febrero	49	9,39
3	marzo	35	6,70
4	abril	34	6,51
5	mayo	57	10,92
6	junio	47	9,00
7	julio	32	6,13
8	agosto	42	8,05
9	septiembre	50	9,58
10	octubre	62	11,88
11	noviembre	49	9,39
12	diciembre	32	6,13
	Total	522	100,0

Tabla 6. Frecuencia mensual de nacimientos expresada como número de nacimientos mensuales y como porcentaje del total de nacimientos registrados en la ciudad de Santa Fe entre los años 1990 y 2010.

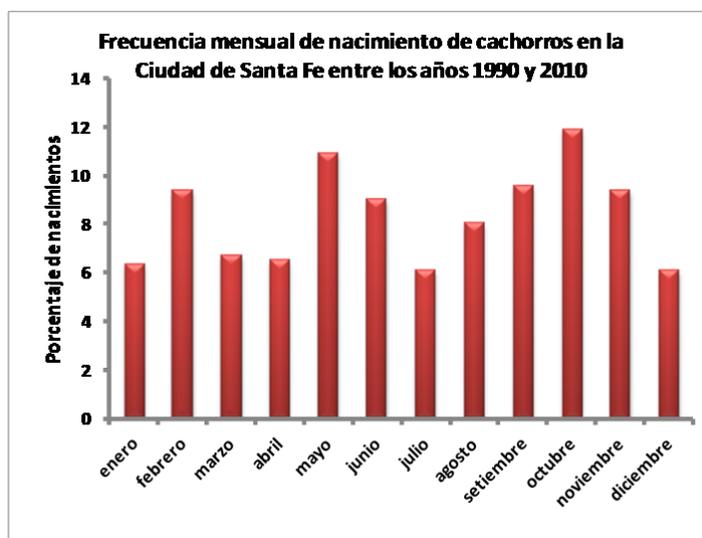


Figura 8. Frecuencia mensual de nacimientos expresada como porcentaje del total de nacimientos registrados en la ciudad de Santa Fe entre los años y 2010 (n = 522).

Nuestros hallazgos de frecuencia de presentación de la enfermedad no son coincidentes con lo reportado por Metayer (1986), quien halló un incremento de casos durante los meses de abril y octubre (primavera y otoño en el hemisferio norte).

No conocemos el rigor con el que se realizó el diagnóstico en el cual se basa esta información, ni si se han desagregado correctamente otras enfermedades respiratorias con las cuales debe hacerse el diagnóstico diferencial, riesgo que se corre al tomar la información *ex post* de fichas de un hospital veterinario.

4.2.3. Frecuencia de presentación según estación climática

Los resultados de la frecuencia según la estación climática se presentan resumidos en la **Tabla 7** y se hallan representados gráficamente en la **Figura 9**.

Estación	n	%
Primavera	42	34,43
Verano	19	15,57
Otoño	20	16,39
Invierno	41	33,61

Tabla 7. Frecuencia de presentación estacional de 122 casos de distemper canino diagnosticados en la ciudad de Santa Fe y zona de influencia durante los años 1998 y 2004. Los datos se presentan como número de casos estacionales y como porcentaje del total de individuos diagnosticados.

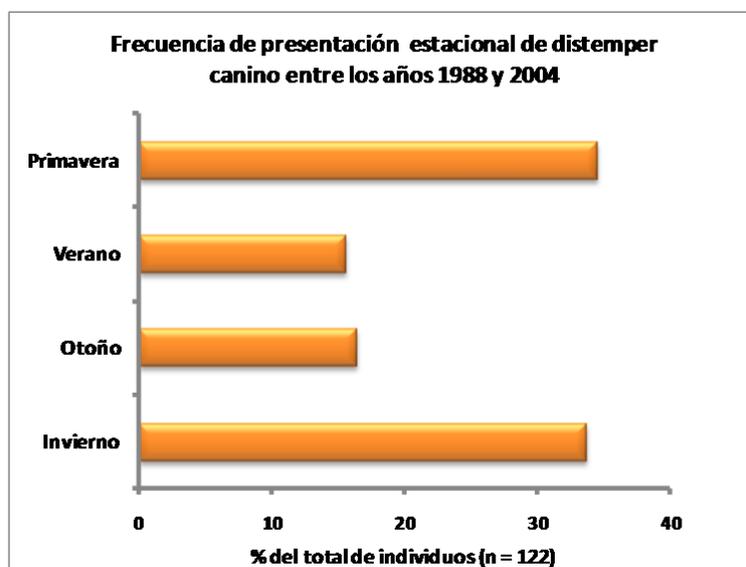


Figura 9. Frecuencia de presentación estacional de 122 casos de distemper canino diagnosticados en la ciudad de Santa Fe y zona de influencia entre los años 1998 y 2004. Los datos se presentan como porcentaje del total de individuos diagnosticados.

La mayor frecuencia se observó durante las estaciones de invierno (33,61%) y primavera (34,43%). Algunos autores (Appel, 1977; Appel y Carmichael, 1979), informan una casuística sin variaciones a lo largo del año. Por su parte Landeros (1988) reporta un mayor número de casos en invierno y Perez (2003), en un relevamiento de diagnósticos realizados en la ciudad de Casilda; Provincia de Santa Fe, encuentra mayor frecuencia de presentación clínica en otoño e invierno.

4.3. Frecuencia de presentación clínica mensual y su relación con la temperatura y la humedad relativa ambiente.

La frecuencia de casos clínicos y las fluctuaciones de temperatura y humedad relativa ambiente en cada mes, entre los años 1998 y 2004, se presentan en la **Tabla 8** y su representación gráfica en la **Figura 10**.

Mes	Casos Clínicos		Temperatura media		HRA	
	n	%	Promedio	DE	Promedio	DE
enero	3	2,46	25,3	0,97	68,4	4,55
febrero	5	4,10	24,2	1,02	72,5	5,24
marzo	6	4,92	23,0	1,21	76,1	7,26
abril	6	4,92	18,2	1,05	80,8	2,64
mayo	5	4,10	15,3	1,52	81,8	3,40
junio	11	9,02	12,8	1,06	83,3	3,69
julio	10	8,20	11,5	1,55	78,3	4,82
agosto	18	14,75	14,0	1,32	72,3	4,28
setiembre	12	9,84	16,3	1,11	67,8	6,18
octubre	14	11,48	19,7	0,69	70,9	8,31
noviembre	28	22,95	21,6	0,65	67,2	5,29
diciembre	4	3,28	23,5	0,78	66,8	4,83

Tabla 8. Frecuencia de presentación clínica mensual de 122 casos de distemper canino diagnosticados en la ciudad de Santa Fe y zona de influencia, temperatura media y humedad relativa ambiente mensual entre los años 1998 y 2004. Los datos de presentación clínica mensual se presentan como número de casos y como porcentaje del total de individuos diagnosticados. La temperatura se expresa en C° y la humedad relativa ambiente (HRA) como %. Ambas variables se expresan como valores promedio y desvío estándar.

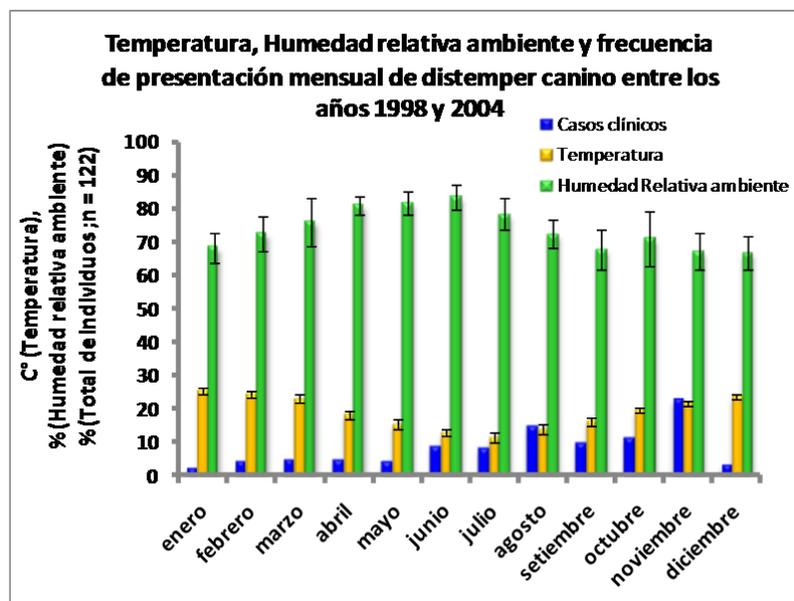


Figura 10. Frecuencia de presentación clínica mensual de 122 casos de distemper canino diagnosticados en la ciudad de Santa Fe y zona de influencia, temperatura media y humedad relativa ambiente mensual entre los años 1998 y 2004. Los datos de presentación clínica mensual se presentan como porcentaje del total de individuos diagnosticados. La temperatura se expresa en C° y la humedad relativa ambiente (HRA). Ambas variables se expresan como valores promedio y desvío estándar.

Puede observarse que de un total de 122 casos documentados, el número de los mismos se incrementa gradualmente desde el mes de enero en que se registraron tres casos (2,46%), hasta alcanzar el pico en el mes de noviembre con 28 casos (22,95%), para descender luego bruscamente en el mes de diciembre a 4 casos (3,28%).

Por otra parte, entre los valores promedio de temperatura y humedad relativa ambiente se observa una fluctuación contrapuesta. En el caso de la temperatura, sus valores presentan un pico en el mes de enero ($25,3 \pm 0,97$ °C) para ir descendiendo hasta el mes de julio ($11,5 \pm 1,55$ °C) y a partir de allí comenzar a incrementarse.

Lo opuesto sucede con la HRA, que presenta su mínimo valor en diciembre ($66,8 \pm 4,83$ %) para ir aumentando gradualmente hasta alcanzar su pico en junio ($83,3 \pm 3,69$ %).

Es importante destacar que entre los meses de enero y mayo inclusive (verano-otoño), el número de casos clínicos fue muy bajo, fluctuando entre valores de 3 a 6, lo que representa un porcentaje menor al 5% del total ($n = 122$), para incrementarse a partir

del mes de junio con 11 casos que representan el 9,02% del total, exactamente en el período del año (invierno) donde se registran las menores temperaturas y el mayor registro de HRA (**Tabla 8 y Figura 10**).

A partir de ese momento, fue posible observar una curiosa relación entre el número de casos clínicos, la temperatura y la HRA, ya que a partir de junio el número de casos se incrementó en forma casi proporcional al aumento de la temperatura, y de manera inversamente proporcional al descenso de la HRA.

En las enfermedades infecciosas en general, la aparición de casos clínicos obedece a factores determinantes como la presencia del virus entre la población y a factores predisponentes entre los que podemos mencionar:

- escasa inmunidad pasiva por deficiente calostrado.
- pérdida de la misma sin el correspondiente desarrollo de inmunidad activa.
- inmunosupresión causada por el estrés del destete.
- caída de la competencia del sistema inmune en los animales seniles.
- bajas temperaturas (para todas las enfermedades respiratorias).

Estos factores explicarían el mantenimiento de la enfermedad dentro de la población, lo que se refleja en los bajos y casi constantes porcentajes de casos clínicos en la primera mitad del año.

A los fines de interpretar la mayor frecuencia de presentación de casos clínicos a partir del segundo semestre, proponemos que las bajas temperaturas invernales prolongarían la viabilidad del virus en el ambiente, y a causa de ello encontraría mejores condiciones para infectar hospedadores.

Por otra parte, las bajas temperaturas predisponen a la aparición de enfermedades respiratorias, y el comienzo de la escalada en el número de casos observados en los meses de junio y julio, coincide justamente con la época del año en la que históricamente se registran las menores temperaturas, lo que sugiere que este factor podría tener un significativo impacto en la aparición de la enfermedad.

Además, debe considerarse como factor de alta importancia la presencia de una población susceptible, y dado que esta se compone mayoritariamente de individuos

jóvenes, el incremento de casos clínicos observado a partir de junio con pico en el mes de noviembre, estaría dado por la acumulación de individuos nacidos durante el semestre diciembre-mayo, y éstos actuarían como un factor de amplificación de la infección al incrementar la eliminación de partículas virales al ambiente.

Este fenómeno tendría su culminación al final de la primavera, donde coincidirían una disminución del número de animales susceptibles y una disminución de la viabilidad del virus en el ambiente. A partir de ese momento, los casos se tornarían esporádicos para recomenzar el ciclo al inicio del próximo invierno.

Similares observaciones fueron hechas por Headley y Graça (2000), quienes reportaron la frecuencia mensual de distemper canino a partir de 250 casos diagnosticados en el Departamento de Patología Veterinaria de la Universidad Federal de Santa María Brasil, entre los años 1985 y 1997 y su relación con la temperatura promedio y la HRA. Los resultados hallados por este grupo de investigadores se presentan en la **Tabla 9** y en la **Figura 11**.

Mes	Casos Clínicos		Temperatura (°C)	HRA (%)
	n	%	Promedio	Promedio
enero	10	4,00	44,0	70,0
febrero	6	2,40	43,0	74,0
marzo	10	4,00	40,0	77,0
abril	10	4,00	33,0	84,0
mayo	12	4,80	27,0	85,0
junio	18	7,20	22,0	85,0
julio	20	8,00	21,0	80,0
agosto	28	11,20	27,0	79,0
setiembre	48	19,20	28,0	80,0
octubre	37	14,80	34,0	80,0
noviembre	35	14,00	40,0	77,0
diciembre	16	6,40	47,0	68,0

Tabla 9. Frecuencia de presentación clínica mensual de 250 casos de distemper canino diagnosticados en el Departamento de Patología Veterinaria de la Universidad Federal de Santa María Brasil entre los años 1985 y 1997 y su relación con la temperatura y la humedad relativa ambiente (HRA) Los datos se presentan como número de casos mensuales diagnosticados y como porcentaje del total de individuos. La temperatura se expresa en C° y la HRA como %. Ambas variables se expresan como valores promedio. Adaptado de Headley and Graça (2000).

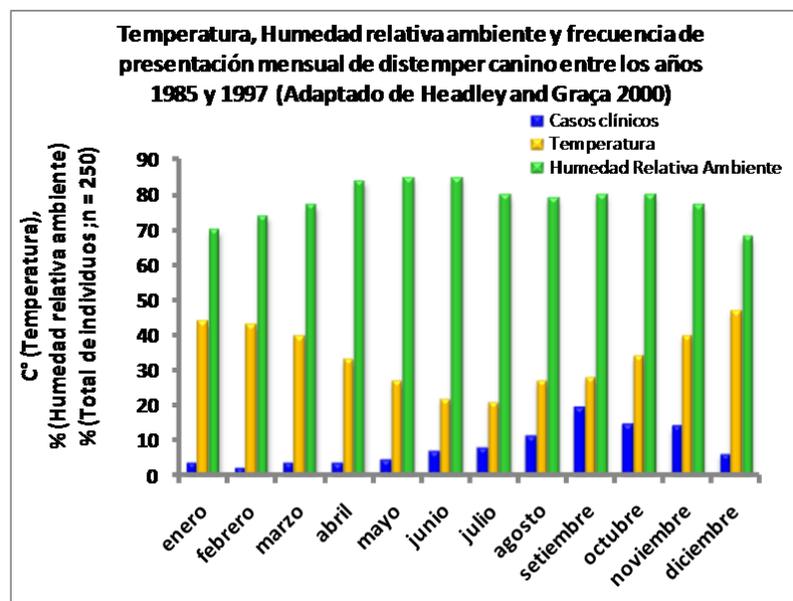


Figura 11. Frecuencia de presentación clínica mensual de 250 casos de distemper canino diagnosticados en el Departamento de Patología Veterinaria de la Universidad Federal de Santa María Brasil, entre 1985 y 1997 y su relación con la temperatura y la humedad relativa ambiente (HRA). Los datos se presentan como número de casos mensuales diagnosticados y como porcentaje del total de individuos. La temperatura se expresa en C° y la HRA como %. Ambas variables se expresan como valores promedio. Adaptado de Headley and Graça (2000).

El trabajo realizado por estos autores consistió en establecer una relación entre la presentación mensual de casos clínicos y las variables ambientales en estudio a partir de una evaluación *ex post* de diagnósticos de distemper canino realizado a partir de cadáveres que se remitieron a la mencionada institución para necropsia y análisis histopatológico, por lo que la información reportada constituye la frecuencia de presentación sólo de casos que evolucionaron en forma desfavorable.

Aunque las condiciones ambientales reportadas en ese estudio no coincidieron con las que se presentaron en la Ciudad de Santa Fe y zona de influencia, y el diseño experimental fue diferente, consideramos sin embargo que estos resultados pueden ser un buen indicador de la frecuencia de presentación mensual de la enfermedad en una población.

La comparación de la frecuencia de presentación de casos clínicos mensuales observados por nosotros en la ciudad de Santa Fe y zona de influencia entre los años 1998 y 2004 y los hallazgos reportados por Headley and Graça (2000) entre los años 1985 y 1997 se presentan resumidos en la **Tabla 10** y la **Figura 12**.

Mes	Casos Clínicos Santa Fe y zona de influencia años 1998 y 2004 n = 122		Diagnósticos Clínicos Headley and Graça (2000) años 1985-1997 n = 250	
	n	% total	n	% total
enero	3	2,46	10	4,00
febrero	5	4,10	6	2,40
marzo	6	4,92	10	4,00
abril	6	4,92	10	4,00
mayo	5	4,10	12	4,80
junio	11	9,02	18	7,20
julio	10	8,20	20	8,00
agosto	18	14,7	28	11,20
setiembre	12	9,84	48	19,20
octubre	14	11,3	37	14,80
noviembre	28	22,9	35	14,00
diciembre	4	3,28	16	6,40

Tabla 10. Comparación entre la frecuencia de presentación clínica mensual de distemper canino observada en la ciudad de Santa Fe y zona de influencia (n=122), entre los años 1998 y 2004 y los casos diagnosticados en el Departamento de Patología Veterinaria de la Universidad Federal de Santa María Brasil (n=250), entre los años 1985 y 1997 (Headley and Graça 2000). Los datos se presentan como número de casos mensuales y como porcentaje del total de individuos diagnosticados.

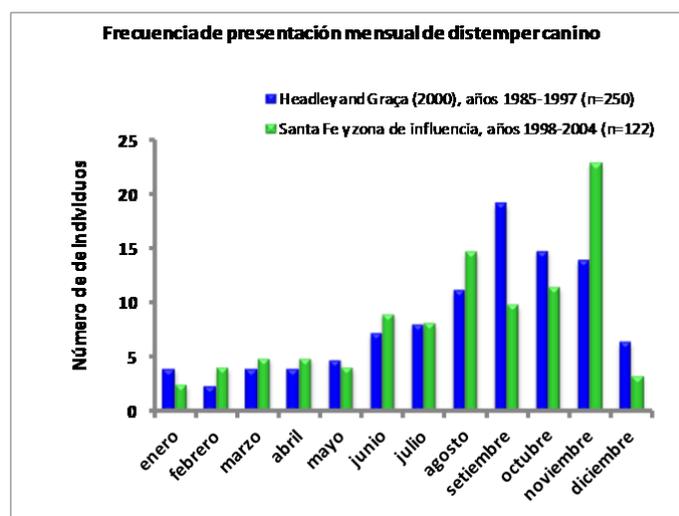


Figura 12. Comparación entre la frecuencia de presentación clínica mensual de distemper canino observada en la ciudad de Santa Fe y zona de influencia entre los años 1998 y 2004 (n = 122) y los casos diagnosticados en el Departamento de Patología Veterinaria de la Universidad Federal de Santa María Brasil, entre los años 1985 y 1997 (Headley and Graça 2000). Los datos se presentan como número de casos mensuales y como porcentaje del total de individuos diagnosticados.

4.4. Evolución clínica según la estación climática

Los resultados de la frecuencia de evolución clínica según estación climática se presentan resumidos en la **Tabla 11** y se hallan representados gráficamente en la **Figura 13**.

Estación	Evolución favorable		Evolución desfavorable	
	n	%	n	%
Primavera	33	78,6	9	21,4
Verano	15	78,9	4	21,1
Otoño	13	65,0	7	35,0
Invierno	33	80,5	8	19,5

Tabla 11. Evolución clínica estacional de 122 casos de distemper canino diagnosticados en la ciudad de Santa Fe y zona de influencia entre los años 1998 y 2004. Los datos se presentan como porcentaje del total de individuos diagnosticados en cada estación climática.

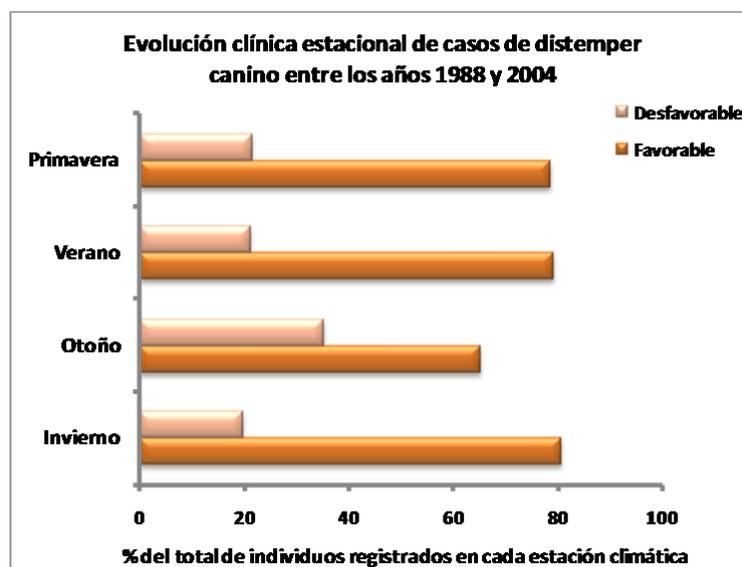


Figura 13. Evolución clínica estacional de 122 casos de distemper canino diagnosticados en la ciudad de Santa Fe y zona de influencia entre los años 1998 y 2004. Los datos se presentan como porcentaje del total de individuos diagnosticados en cada estación climática.

Si tomamos en cuenta la evolución de la enfermedad, podemos observar que el mayor porcentaje de casos desfavorables se producen en otoño (35,0%), hecho no coincidente con el pico de presentación clínica observado en invierno y primavera.

Al intentar correlacionar este hecho con alguna de las variables en estudio, observamos que es coincidente con la época en que se registra descenso de la temperatura con incremento de la humedad relativa ambiente. Esto podría atribuirse a un aumento en las condiciones de stress, con la consecuente disfunción del sistema inmune.

4.5. Frecuencia de presentación según sexo, tamaño y edad

La frecuencia de presentación de la enfermedad asociada al sexo, expresada como porcentaje del total de diagnósticos de distemper canino realizados entre los años 1998 y 2009, se presenta en la **Tabla 12** y en la **Figura 14**. Los resultados obtenidos muestran una mayor casuística en machos (63,08%) respecto de hembras (36,92%).

Sexo	n	%
Macho	82	63,08
Hembra	48	36,92
Total^(*)	130	100,00%

(*) no se dispuso de datos de un individuo.

Tabla 12. Presentación de casos clínicos de distemper canino según sexo en la ciudad de Santa Fe y zona de influencia entre los años 1998 y 2009. Los datos se presentan como número de casos y como porcentaje del total de individuos diagnosticados.

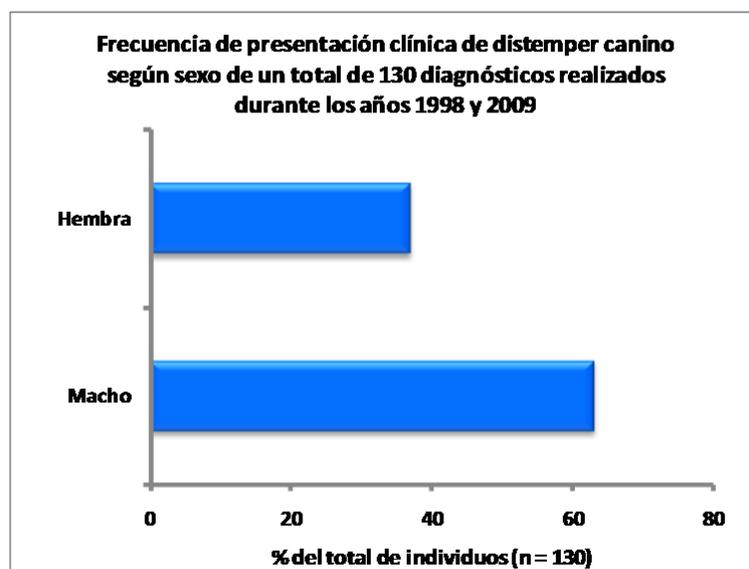


Figura 14. Presentación de casos clínicos de distemper canino según sexo en la ciudad de Santa Fe y zona de influencia entre los años 1998 y 2009. Los datos se presentan como porcentaje del total de individuos diagnosticados.

Estos resultados podrían llegar a ser interpretados como una mayor susceptibilidad a padecer la enfermedad por parte de los caninos machos, o de un mayor riesgo relativo de contagio de los mismos debido a su hábito ambulatorio, el cual favorecería el contacto con individuos infectados.

Para corroborar o refutar estas hipótesis, se consideró necesario tomar como referencia algún censo poblacional a fin de realizar comparaciones y extraer conclusiones al respecto. Al no disponer de datos de la ciudad de Santa Fe, se tomó con las salvedades del caso, el censo realizado por Morales y colaboradores (1993) en la comuna de Santiago (Chile) en que de un total de 319 caninos, un 59,6% eran machos y un 40,4% eran hembras.

Esta proporción entre machos y hembras fue comparada con la observada en nuestro estudio mediante el test de χ^2 , no hallándose diferencias entre ambas ($p > 0,05$) (Tabla 13 y Figura 15).

Variables	Presentación clínica (PC)		Censo poblacional (CP)	
	n	%	n	%
Machos (M)	82	63,08	190	59,60
Hembras (H)	48	36,92	129	40,40
Total(*)	130	100,00	319	100,00
Relación M/H	1,70		1,47	

(*) no se dispuso de datos de un individuo.

Tabla 13. Proporción de caninos machos y hembras observados en un censo poblacional (Morales *et al.*, 1993) y en el relevamiento realizado a partir de la presentación clínica en la ciudad de Santa Fe y zona de influencia entre los años 1998 y 2009. Los datos se expresan como número de animales de uno y otro sexo y como porcentaje del total de individuos de cada muestra. No se hallaron diferencias entre las dos proporciones ($p > 0,05$).

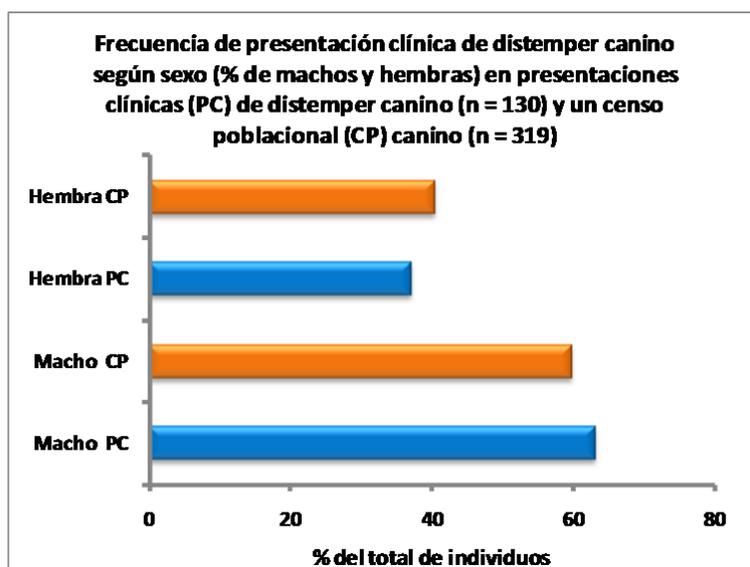


Figura 15. Proporción de caninos machos y hembras observados en un censo poblacional (Morales *et al.*, 1993) y en el relevamiento realizado a partir de la presentación clínica en la ciudad de Santa Fe y zona de influencia entre los años 1993 y 2009. Los datos se expresan como porcentaje del total de individuos de cada muestra.

De lo expresado se infiere que la proporción de individuos de uno u otro sexo en relación a la casuística de la enfermedad, se correspondería con la distribución de estas variables en la población, por lo que puede concluirse que en el supuesto que en la región se mantenga la misma proporción que la observada por Morales y colaboradores (1993), el mayor número de casos clínicos en machos obedecería a un porcentaje superior de individuos de este sexo y no a su mayor susceptibilidad a padecer la enfermedad.

Los datos de casuística asociada al tamaño del animal se presentan en la **Tabla 14** y la **Figura 16**. Éstas muestran que un 40,00% de los diagnósticos se realizó en animales de gran porte, un 42,31% en animales medianos y el resto (17,69%) en animales de pequeño tamaño.

Tamaño	n	%
Chico	23	17,69
Mediano	55	42,31
Grande	52	40,00
Total ^(*)	130	100,00

^(*) no se dispuso de datos de un individuo.

Tabla 14. Frecuencia de presentación de casos clínicos de distemper canino según tamaño del animal, diagnosticados en la ciudad de Santa Fe y zona de influencia entre los años 1998 y 2009. Los datos se presentan como número de casos y como porcentaje del total de individuos diagnosticados.

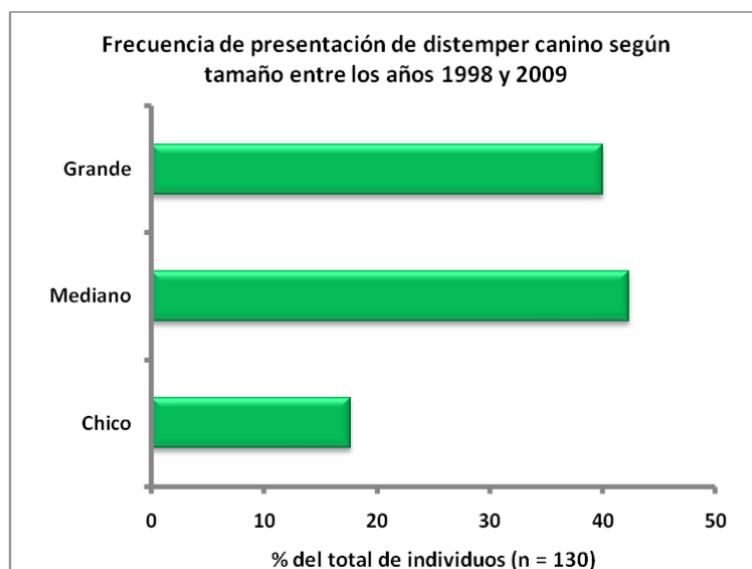


Figura 16. Frecuencia de presentación de casos clínicos de distemper canino según tamaño del animal, diagnosticados en la ciudad de Santa Fe y zona de influencia entre los años 1998 y 2009. Los datos se presentan como porcentaje del total de individuos diagnosticados.

A fin de disponer de valores de referencia de la frecuencia de distribución de la talla de los caninos en la ciudad de Santa Fe y zona de influencia, se obtuvieron datos de caninos que arribaron a nuestra clínica durante el período que comprendió el estudio, obtenidos de fichas seleccionadas al azar. Los resultados fueron que de un total de 116 caninos, 34 (29,31%) fueron de pequeña talla, 34 (29,31%) medianos y 48 (41,38%) de gran porte.

Las proporciones de caninos según su talla observadas en el relevamiento de fichas entre los años 1998 y 2009 y los casos de distemper que se presentaron durante el mismo período se muestran en la **Tabla 15** y la **Figura 17**.

Estas proporciones se compararon con las observadas en nuestro estudio mediante el test de χ^2 , hallándose que las mismas fueron diferentes ($p < 0,05$).

Para evaluar objetivamente estos resultados, es necesario considerar que los datos obtenidos presentan sesgos importantes. Tanto en el caso de los caninos afectados por distemper como en los que acudieron a la clínica por causas varias, el común denominador es que en primer lugar pertenecen a una subpoblación de caninos con dueño y, en segundo lugar, que éstos asumieron el compromiso de realizar la consulta al profesional veterinario. Esto deja fuera de consideración a los perros sin dueño y a los que no son llevados a la veterinaria por los mismos.

Sin embargo, ante la ausencia de datos provenientes de censos poblacionales, podemos considerar a la información obtenida por el relevamiento de fichas como un indicador aproximado de la frecuencia de distribución de la talla de los caninos en la ciudad de Santa Fe y zonas aledañas.

Categorías	Relevamiento de fichas		Presentación clínica	
	n	%	n	%
Chicos	34	29,31	23	17,69
Medianos	34	29,31	55	42,31
Grandes	48	41,38	52	40,00
Total	116	100,00	130 ^(*)	100,00

(*) no se dispuso de datos de un individuo.

Tabla 15. Proporción de caninos según talla (chico, mediano y grande) observados en un relevamiento de fichas clínicas entre los años 1998 y 2009 y casos de distemper canino observados en el mismo período. Los datos se expresan como número de animales en cada categoría y como porcentaje del total de individuos de cada muestra.

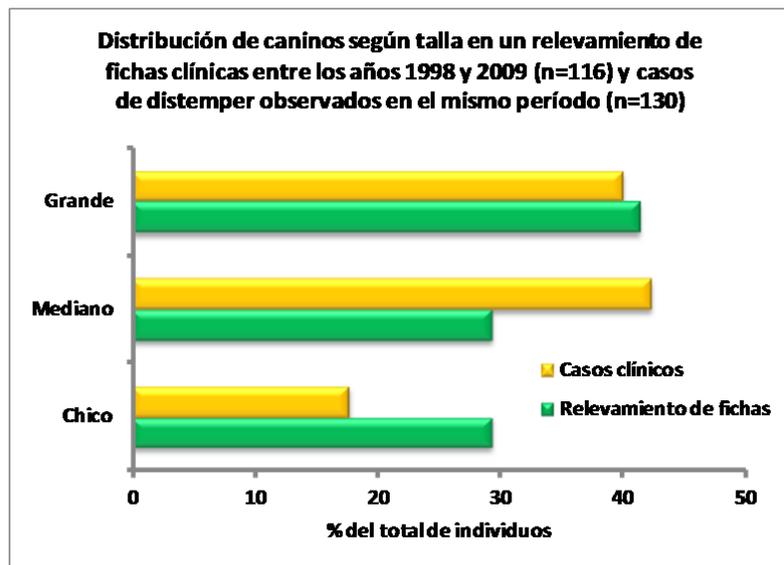


Figura 17. Proporción de caninos según talla (chico, mediano y grande) observados en un relevamiento de fichas clínicas entre los años 1998 y 2009 y casos de distemper canino observados en el mismo período. Los datos se expresan como porcentaje del total de individuos de cada muestra.

La disímil proporción entre tallas de caninos observadas entre las dos muestras que se presentan en la **Tabla 15** y la **Figura 17**, indican que estas diferencias se producen entre los caninos de talla mediana y chica.

En un intento por explicar estos resultados, podríamos considerar que la menor proporción de animales de pequeña talla, se debería a que éstos gozarían de mayores cuidados por parte de sus propietarios, lo que se reflejaría en un cumplimiento más estricto de los planes de profilaxis (vacunaciones, desparasitaciones) y en condiciones de vida más benignas, ya que en la mayoría de los casos éstos habitan normalmente dentro de la casa de familia, con menor exposición al ambiente de la calle, lo que reduciría el contacto con los animales infectados.

Con respecto a la edad, la mayor frecuencia se observa en caninos menores a 2 años (73,64%), mientras el porcentaje observado en adultos de hasta 10 años es del 24,81% y en animales seniles del 1,55% (**Tabla 16** y **Figura 18**).

Categoría	edad (años)	n	%
Cachorro	0 a 2	95	73,64
Adulto	2 a 10	32	24,81
Senil	más de 10	2	1,55
Total ^(*)		129	100,00

(*) no se dispuso de datos de dos individuos.

Tabla 16. Frecuencia de presentación de casos clínicos de distemper canino según edad, diagnosticados en la ciudad de Santa Fe y zona de influencia entre los años 1998 y 2009. Los individuos se agrupan en tres categorías: cachorros (hasta 2 años de edad); adultos (desde 2 a 10 años) y seniles (mayores a 10 años).

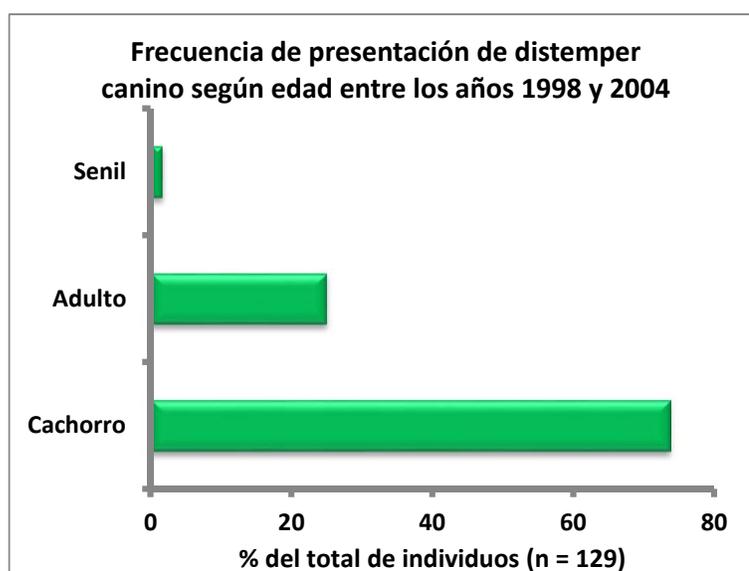


Figura 18. Frecuencia de presentación clínica de 129 casos de distemper canino diagnosticados en la ciudad de Santa Fe y zona de influencia entre los años 1998 y 2009. Los individuos se agrupan en tres categorías: cachorros (hasta 2 años de edad); adultos (desde 2 a 10 años) y seniles (mayores a 10 años) y el número de casos se expresa como % del total de individuos.

Estos porcentajes se explican por la mayor susceptibilidad de los animales jóvenes a padecer la enfermedad, respecto de las otras categorías, por las razones expuestas anteriormente.

Los resultados concuerdan con los hallazgos reportados por Headley y Graça (2000) quienes en un relevamiento realizado entre los años 1985 y 1997 en el Departamento de Patología Veterinaria de la Universidad Federal de Santa María, Brasil, informaron que el 62,80% de los casos de distemper atendidos durante ese período, correspondió a caninos menores a 1,5 años y solo el 6,40% a mayores de 6 años.

Asimismo nuestros hallazgos son coincidentes con los reportados por Morales y colaboradores (1997), quienes tras revisar 1112 fichas con diagnóstico de distemper canino del Servicio de Clínica Menor de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile, hallaron que el 83% de los individuos eran menores de un año.

Lo expresado muestra alta incidencia de la enfermedad en individuos no mayores a dos años de edad. Sin embargo, para concluir que esta categoría de animales constituye en sí un grupo etario de riesgo, es menester contar con datos provenientes de censos poblacionales, a fin de conocer la verdadera relación entre caninos de escasa edad y adultos.

Ante la carencia de una referencia local, tomamos el citado estudio de caracterización de la población canina en la comuna de Santiago, Chile, realizado por Morales y colaboradores (1993), quienes informaron que de una muestra de 319 caninos, la base de la pirámide poblacional estaba conformada por individuos jóvenes, de los cuales aquellos cuya edad estaba comprendida entre cero y dos años representaba el 36,05 % de la población, tal como se presenta en la **Tabla 17** y la **Figura 19**.

La estructura de esta pirámide poblacional da mayor solidez a lo observado en nuestro trabajo. La mayor susceptibilidad registrada entre los cachorros, es compatible con la interpretación corriente que la atribuye a la falta de estímulo específico e inespecífico del sistema inmune en edad temprana (Greene and Appel, 2006). Durante la senilidad las funciones vitales, entre ellas las del sistema inmune, están en fase de declinación y si bien no surge del estudio un incremento de casuística en este grupo etario no podemos descartarlo, pues disponemos de un “n” pequeño, insuficiente para estudios estadísticos válidos.

Categoría	edad (años)	n	%
Cachorro	0 a 2	115	36,05
Adulto	2 a 10	195	61,13
Senil	más de 10	9	2,82
Total		319	100,00

Tabla 17. Caracterización de la población canina según edad de individuos agrupados en tres categorías: cachorro (hasta 2 años de edad); adulto (desde 2 a 10 años) y senil (mayor a 10 años). Adaptado de Morales y colaboradores (1993).

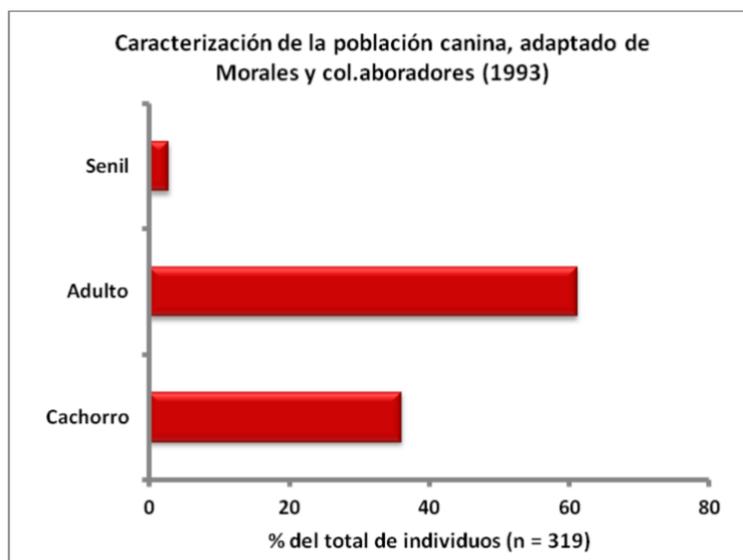


Figura 19. Caracterización de la población canina según edad de individuos agrupados en tres categorías: cachorro (hasta 2 años de edad); adulto (desde 2 a 10 años) y senil (mayor a 10 años) y el número de casos se expresa como % del total de individuos. Adaptado de Morales y colaboradores (1993).

4.6. Respuesta al tratamiento de distemper adicionando lipopolisacáridos bacterianos o azatioprina a la terapéutica convencional.

Los resultados de la evolución clínica observados en cada uno de los esquemas terapéuticos utilizados (terapéutica de sostén, terapéutica de sostén más LPS_B y terapéutica de sostén más AZP) se presentan en la **Tabla 18** y la **Figura 20**.

Tratamiento	Sostén		LPS _B		AZP	
Evolución Clínica	Total n = 57		Total n = 48		Total n = 26	
Favorable	41	(71,93%)	38	(79,17%)	20	(76,92%)
Desfavorable	16	(28,07%)	10	(20,83%)	6	(23,08%)

Tabla 18. Evolución clínica (favorable-desfavorable) de tres grupos de caninos afectados por distemper, que fueron tratados con terapéutica de sostén, terapéutica de sostén mas LPS_B y terapéutica de sostén más AZP. Los diagnósticos clínicos fueron realizados entre los años 1998 y 2009. Los datos se expresan como número de animales en cada categoría y como porcentaje del total de individuos de cada tratamiento.

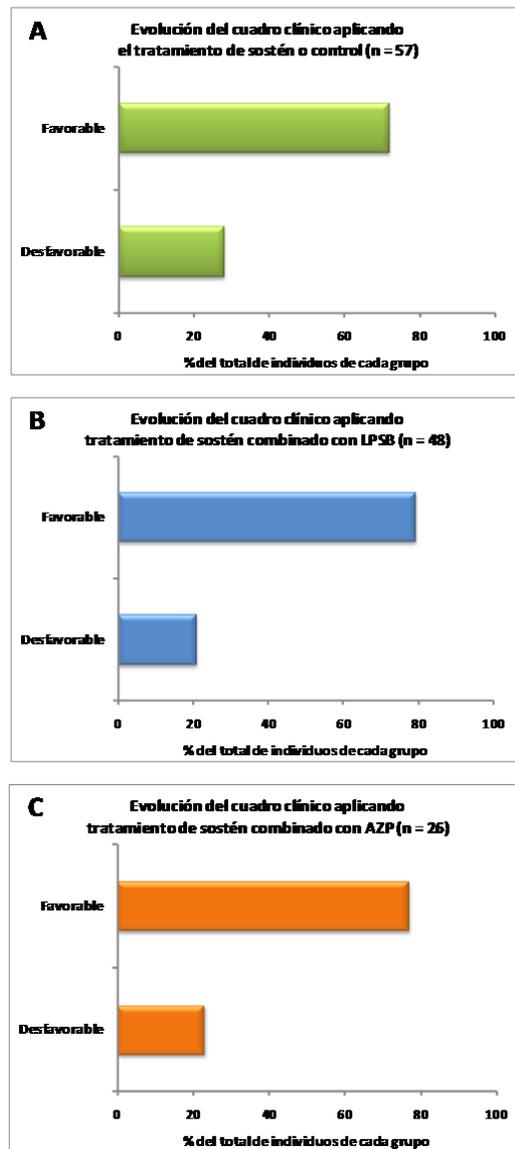


Figura 20. Representación gráfica de la evolución clínica de tres grupos de caninos afectados por distemper, que fueron tratados con (A) terapéutica de sostén, (B) terapéutica de sostén más LPS_B y (C) terapéutica de sostén más AZP. El número de casos se expresa como % del total de individuos de cada tratamientos.

En cada uno de los tratamientos se observó una evolución favorable superior al 70% sin detectar diferencias entre los grupos ($p > 0,05$), lo que nos permitió inferir que no existiría ningún beneficio terapéutico que justifique la adición de LPS_B o AZP a las terapias de sostén.

Cabe la posibilidad de que el número de individuos incluidos en este ensayo, no fuera suficientemente grande como para garantizar una adecuada potencia del test estadístico utilizado (χ^2), por lo que es posible que utilizando un “n” mayor se hubiese podido hallar diferencias entre alguno de los esquemas terapéuticos ensayados en este estudio.

No obstante, las diferencias que se hubieran podido confirmar desde un punto de vista estadístico, no serían de importancia desde un punto de vista clínico, ya que difícilmente un profesional podría a partir de la casuística cotidiana percibir diferencias entre uno u otro esquema terapéutico utilizado.

Consideramos que nuestros hallazgos constituyen un aporte para el esclarecimiento de numerosas opiniones que circulan en el ámbito profesional y académico, provenientes en su mayor parte de la experiencia cotidiana o de la casuística diaria de muy difícil justificación, ya que un clínico al evaluar la eficacia de un esquema terapéutico, se basa generalmente en un número limitado de casos, normalmente sin utilizar grupos control.

4.6.1. Respuesta a los tratamientos expresados como días de evolución favorable.

Debido a que se no hallaron diferencia entre las proporciones de individuos con evolución favorable y desfavorable entre los tres tratamientos, se decidió evaluar la eficacia terapéutica tomando en consideración la rapidez con la que se producía la resolución favorable.

El tiempo de recuperación de evolución favorable se estimó como el número de días contabilizados desde el momento en que se realizó la primer consulta, hasta el día en que el paciente fue dado de alta.

Los datos de días de evolución favorable según el tipo de terapéutica instaurada se hallan representados en la **Figura 21**.

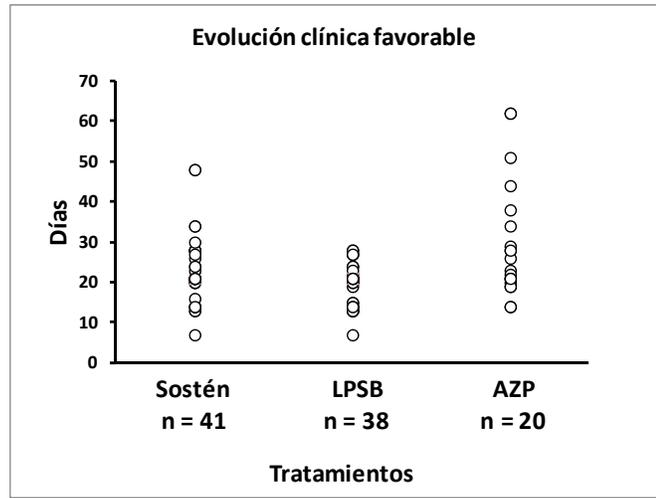


Figura 21. Representación gráfica de los días de evolución favorable de tres grupos de caninos afectados por distemper que fueron tratados con terapéutica de sostén, terapéutica de sostén más LPS_B y terapéutica de sostén más AZP.

De la inspección visual de la **Figura 21**, se evidencia que los datos de los días de evolución favorable presentan diferentes patrones de dispersión en cada uno de los tres esquemas terapéuticos realizados.

En base a la apreciación de la diferencia en la magnitud de la dispersión de los datos experimentales el análisis estadístico consistió en:

- estadística descriptiva de los datos correspondientes a los días de evolución favorable en cada uno de los tratamientos realizados.
- demostrar que los datos experimentales de estos tres grupos presentan similitud de varianzas (homocedasticidad), una condición fundamental que deben reunir para ser analizados mediante procedimientos de estadística paramétrica.

Este requisito se basa en el concepto de hipótesis nula que se plantea al inicio de cada estudio estadístico, donde se parte del supuesto que las muestras no son diferentes entre sí y que provienen de la misma población.

Si las muestras a comparar tienen varianzas diferentes se puede optar por tres posturas:

- concluir que las poblaciones de las cuales provienen son diferentes; en nuestro caso es asumir que los tratamientos tienen efectos diferentes.
- transformar los datos experimentales para igualar varianzas y comparar los grupos con un test paramétrico.
- realizar la comparación utilizando un test no paramétrico.

Considerando el contexto experimental de este ensayo, es de indiscutible importancia la variabilidad de los días en los cuales el profesional puede esperar que se produzca la resolución favorable del cuadro clínico, ya que un tratamiento que aporte evidencia de lograr la recuperación del paciente en menor tiempo y que ese tiempo sea más o menos similar para todos, es un elemento a favor para la elección de un esquema terapéutico respecto de otro, cuyos resultados expresados como días de resolución sean impredecibles, y su evolución pueda llegar a prolongarse en demasía.

En base a lo expuesto, se decidió omitir los procedimientos de transformación de datos y la comparación con un test paramétrico por las razones que se explican a continuación.

En primer lugar, en lo que atañe a la transformación de los datos experimentales, ésta se realiza transformándolos a sus logaritmos decimales (\log_{10}) o en su inversa ($1/n$). Este procedimiento tiene por objeto igualar las varianzas, para que los promedios de los grupos puedan ser comparados con un test paramétrico.

El tema de la transformación de los datos experimentales ha generado siempre mucha controversia en estadística, ya que hay tantas razones a favor como en contra para aplicarla.

En nuestra situación, transformar los datos experimentales a sus logaritmos decimales igualaría las varianzas, pero este procedimiento no aportaría veracidad al análisis, ya que la transformación logarítmica estaría enmascarando un hecho concreto que es la desigual dispersión del tiempo de recuperación de los pacientes.

Desde punto de vista clínico-práctico, es más importante la información generada por el conocimiento de la medida de la dispersión de los días de recuperación de los pacientes, que la determinación de diferencias entre los valores promedio del tiempo de recuperación de los mismos.

Se decidió no emplear un test no paramétrico porque se estarían analizando los datos experimentales con un procedimiento de menor potencia, la cual se manifiesta en un mayor error de tipo β , es decir que el test no va a hallar diferencias entre los grupos, aún si estas estuvieran presentes y deberíamos determinar a posteriori si ello se debió a la falta de potencia del test por inadecuado tamaño de la muestra.

Además, se incurriría en el error de evaluar la eficacia de un tratamiento según la duración del tiempo de recuperación de los pacientes, comparando otra medida de tendencia central como lo es la mediana.

La estadística es una herramienta de cuyo uso se obtienen resultados en base a los cuales el investigador va a determinar la importancia de las diferencias halladas según el conocimiento del sistema biológico que esté estudiando.

Por lo tanto, nosotros consideramos que la diferencia entre varianzas constituye en este caso una información estadística que nos proporciona evidencia racional acerca de las ventajas y/o desventajas de los tres esquemas terapéuticos ensayados en este estudio de tesis.

El análisis estadístico para testear la homocedasticidad de las varianzas se realizó en dos pasos. En primer lugar, se testeó la igualdad de desvíos estándar de los tres grupos experimentales juntos, empleando el test de Bartlett. En segundo lugar se testeó la igualdad de desvíos estándar entre cada uno de los tratamientos alternativos versus el tratamiento control con el test de F.

Los resultados del estudio de estadística descriptiva realizada con los datos experimentales de tiempo de evolución favorable se presentan en la **Tabla 19**.

Evolución Clínica Favorable			
Parámetros	Tratamientos		
	Sostén	LPS_B	AZP
Promedio (días)	22,90	19,60	29,80
n	41	38	20
Desvío Std. (días)	8,07	4,90	14,50
Coefficiente de variación (%)	35,20	25,00	48,7
Error Std. (días)	1,26	0,79	3,24
Mínimo (días)	7	7	14
Mediana (días)	21,00	21,0	24,50
Máximo (días)	48	28	62
Lim. inf. IC 95%(días)	20,30	18,00	23,00
Lim. sup. IC 95% (días)	25,40	21,30	36,60

Tabla 19. Estadística descriptiva de los días de evolución favorable de tres grupos de caninos afectados por distemper tratados con terapéutica de sostén, terapéutica de sostén más LPS_B y terapéutica de sostén más AZP.

A partir de la inspección visual de los datos de estadística descriptiva, se puede apreciar que los valores promedio de duración de los tratamientos no presentan grandes diferencias, siendo para el tratamiento de sostén de $22,90 \pm 8,07$ días, para el tratamiento de sostén más LPS_B de $19,60 \pm 4,90$ días y para el tratamiento de sostén más AZP de $29,80 \pm 14,50$ días. No obstante la diferencia más significativa se observa en los valores del desvío estándar.

La diferencia entre la magnitud de la dispersión de los datos experimentales se puede evidenciar a partir de tres tipos de parámetros: los valores mínimos y máximos observados, el desvío estándar y el coeficiente de variación.

Los valores mínimos y máximos de los días de evolución favorable observados, proporcionan la primera evidencia del impacto clínico de los tres esquemas terapéuticos, ya que en el caso del tratamiento que incluye AZP, la amplitud del tiempo de recuperación clínica abarcó desde 14 hasta 62 días, mayor a la observada en el tratamiento que incorporó LPS_B, con una amplitud desde 7 a 28 días. En un lugar intermedio se halló el tratamiento de sostén que se extendió desde los 7 hasta los 48 días.

Aunque los valores promedio fueron diferentes entre sí, la diferencia más importante es la que se presentó entre los valores del desvío estándar de los diferentes tratamientos (**Tabla 19**).

El desvío estándar (DE) es un parámetro que permite evaluar a priori la variabilidad de los valores de una variable dentro de una población.

Las diferencias entre los valores de DE se pueden apreciar mejor usando un parámetro denominado coeficiente de variación (CV), que no es otra cosa que el valor del DE normalizado por el valor promedio estimado y que se expresa como porcentaje.

Este parámetro nos proporcionó una idea acerca de la posible diferencia en la magnitud de la dispersión de los días que tomó la recuperación de los pacientes.

En orden de magnitud tenemos que el CV estimado para los días de evolución con el tratamiento de sostén fue de 35,00%, mientras que para los tratamientos de sostén más LPS_B fue de 25,00% y para el tratamiento de sostén más AZP fue de 48,70%

Los resultados del estudio estadístico para corroborar la homocedasticidad de varianzas se presentan a continuación. En todos los casos el límite de significancia fue fijado en 5% ($p = 0,05$).

Resultado del test de homocedasticidad de varianzas de Bartlett

Los resultados de la comparación de desvíos con el test de Bartlett entre los días de evolución favorable entre los grupos tratados con el tratamiento de sostén, tratamiento de sostén más LPS_B y tratamiento de sostén más AZP se presentan en la **Tabla 20**.

Tratamiento de Sostén, tratamiento de sostén más LPS_B y tratamiento de sostén más AZP.	
Estadístico de Bartlett: 31,499	$p = 0,0001$
El test de Bartlett sugiere que la diferencia entre desvíos de los tres tratamientos es significativa.	

Tabla 20. Resultados de la comparación de desvíos entre los días de evolución favorable entre los grupos tratados con el tratamiento de sostén, tratamiento de sostén más LPS_B y tratamiento de sostén más AZP.

Resultado del test de F de homocedasticidad de varianzas

Los resultados de la comparación de varianzas de los días de evolución favorable entre los grupos tratados con el tratamiento de sostén vs. tratamiento de sostén más LPS_B y entre los grupos tratados con el tratamiento de sostén vs. tratamiento de sostén más AZP se presentan en la **Tabla 21**.

Tratamiento de sostén vs. tratamiento sostén más LPS_B	
Estadístico de F = 2,715	p = 0,0014
El test de F sugiere que la diferencia entre varianzas de los dos tratamientos es significativa.	
Tratamiento de sostén vs. tratamiento sostén más AZP	
Estadístico de F = 3,228	p = 0,0009
El test de F sugiere que la diferencia entre varianzas de los dos tratamientos es significativa.	

Tabla 21. Resultados de la comparación de varianzas entre los días de evolución favorable entre los grupos tratados con el tratamiento de sostén vs. tratamiento de sostén más LPS_B y entre los grupos tratados con el tratamiento de sostén vs. tratamiento de sostén más AZP.

Lo más llamativo de estos resultados es, la diferente amplitud en los días en que se materializa la recuperación de los pacientes con cada uno de los esquemas terapéuticos utilizados.

En orden de valor de varianza tenemos: tratamiento sostén más LPS_B < tratamiento sostén < tratamiento sostén más AZP.

En base a esta relación proponemos las siguientes consideraciones:

En un nivel intermedio de respuesta clínica se halla el tratamiento de sostén, que utilizamos como respuesta o eficacia testigo, empleándolo como punto de referencia para evaluar la incorporación de LPS_B y AZP a este esquema terapéutico.

La diferencia de varianzas en la duración de la evolución favorable, evidencia que la adición tanto de LPS_B como de AZP, si bien no mejoran la proporción de individuos con evolución favorable, actúan modificando la duración de la recuperación clínica.

Se aprecia claramente que el esquema terapéutico que incorpora AZP, origina una gran incertidumbre en cuanto al tiempo de recuperación de los individuos, que se manifestó por valores máximos y mínimos muy alejados entre sí (14 y 62 días) y con un CV de 48,70%, teniendo como consecuencia prolongar demasiado el tiempo de recuperación de muchos pacientes.

Este hallazgo tiene su explicación en el efecto inmunosupresor de la AZP, efecto que es considerado terapéutico para reducir la ocurrencia de rechazos en caso de trasplantes de órganos.

Sin lugar a dudas, el mecanismo de acción de la AZP, puede llegar a interferir en la replicación viral, fenómeno que ha sido demostrado *in vitro* sobre otros virus como por ejemplo el causante de la diarrea viral bovina (Spencer and Striker, 2008).

Sin embargo, no debemos dejar de considerar que las condiciones experimentales con las cuales se realizan los ensayos *in vitro* son “ideales” desde el punto de vista técnico, y no se corresponden de manera lineal con la situación en la cual el medicamento debe interactuar en una entidad viviente.

En este caso, el balance entre la actividad antiviral y la inmunosupresión puede ser negativo, al impedir que las defensas naturales del organismo sean competentes para responder a la infección, resultando mayor el daño provocado que el efecto antiviral.

Debe tenerse en cuenta que la terapéutica antibiótica en las infecciones de origen bacteriano constituye un complemento de la respuesta inmune del individuo para la eliminación de esos agentes (Blondeau, 2009). Sobre esta base, la incertidumbre en la resolución del caso clínico y la mayor duración de los días de recuperación de muchos pacientes, pueden ser atribuidas a la dificultad del organismo para desembarazarse de la infección bacteriana.

Lo contrario ocurre con la incorporación de LPS_B. La **Figura 21** nos muestra claramente que hay una tendencia a que la variabilidad del tiempo de evolución favorable del caso clínico sea menor (CV de 25,00%), y que los valores mínimos y máximos observados se hallen más próximos entre sí (7 y 28 días). Esto representa para el clínico

una respuesta más predecible en el tiempo, pudiendo asumir con mayor certeza que el paciente de evolucionar favorablemente, lo hará dentro de este intervalo de tiempo.

Este hallazgo puede explicarse por la respuesta favorable del sistema inmune, luego de ser estimulado por la “inflamación aséptica” provocada por la administración de los LPS_B.

La recuperación clínica más homogénea, tal como lo demuestra la menor varianza de los datos experimentales obtenidos con el tratamiento que incorpora LPS_B, habla favorablemente de la ventaja de complementar la terapéutica de sostén con un agente estimulante de la respuesta inmune.

En base a lo analizado, concluimos que aún cuando el porcentaje de caninos afectados por distemper con evolución desfavorable no pudo ser reducido por ninguna de las terapéuticas ensayadas en este estudio, la incorporación de LPS_B o AZP a la terapéutica de sostén, pueden modificar el curso de la recuperación del paciente.

Los resultados muestran que no solamente no se obtienen ventajas con la incorporación de AZP al esquema terapéutico de sostén, sino que además evidencian que este fármaco propicia una respuesta desfavorable al prolongar innecesariamente el tiempo de recuperación del paciente.

Por el contrario, la incorporación de LPS_B contribuyó a acortar el tiempo de resolución favorable y a que la amplitud entre días mínimos y máximos de recuperación fuese más homogénea y predecible.

4.6.2. Respuesta a los tratamientos expresados como días de evolución desfavorable.

Considerando que las proporciones entre individuos con evolución favorable y desfavorable no presentaron diferencias entre los tres tratamientos, se evaluó la eficacia terapéutica en función del tiempo en el que ocurría la resolución desfavorable.

El tiempo se estimó como el número de días contabilizados desde el momento de realizada la consulta, hasta la fecha en que se produjo la aparición de signología nerviosa o la muerte del paciente.

Los datos de los días de evolución clínica desfavorable según el tipo de terapéutica instaurada, se hallan representados en la **Figura 22**.

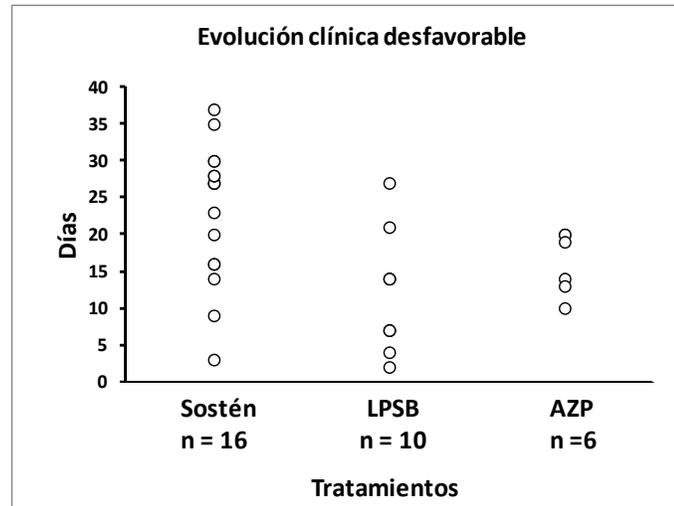


Figura 22. Representación gráfica del tiempo de evolución desfavorable de tres grupos de caninos afectados por distemper, que fueron tratados con terapéutica de sostén, terapéutica de sostén más LPS_B o terapéutica de sostén más AZP.

En la **Figura 22** se evidencia que los datos correspondientes a cada uno de los tres esquemas terapéuticos presentan un patrón de dispersión opuesto al observado en la **Figura 21**.

En base a la apreciación de la diferencia en la magnitud de la dispersión de los datos experimentales, el análisis estadístico consistió al igual que en los casos de evolución favorable en:

- estadística descriptiva de los datos experimentales en cada uno de los tratamientos.
- testear que los datos experimentales presentaran homocedasticidad de varianzas.

En base al contexto de este ensayo, como en el caso anterior, se decidió no realizar la transformación de los datos experimentales y evaluar el efecto de los tratamientos sobre los días de evolución desfavorable testeando la igualdad de varianzas de las muestras.

El análisis estadístico de homocedasticidad de varianzas, se realizó testeando la igualdad de desvíos estándar entre cada uno de los tratamientos alternativos versus el tratamiento control con el test de F.

Los resultados del análisis de los datos experimentales referidos al tiempo de evolución desfavorable se presentan en la **Tabla 22**.

Evolución Clínica Desfavorable			
Parámetros	Tratamientos		
	Sostén	LPS_B	AZP
Promedio (días)	23,1	11,7	16,0
n	16	10	6
Desvío Std. (días)	9,38	7,86	4,24
Coefficiente de variación	40,61	67,18	25,50
Error Std. (días)	2,34	2,48	1,73
Mínimo (días)	3	2	10
Mediana (días)	27	10,5	16,5
Máximo (días)	37	27	20
Lim. inf. IC 95%(días)	18,1	6,07	11,5
Lim. sup. IC 95% (días)	28,1	17,3	20,5

Tabla 22. Estadística descriptiva de los días de evolución desfavorable de tres grupos de caninos afectados por distemper que fueron tratados con terapéutica de sostén, terapéutica de sostén mas LPS_B o terapéutica de sostén más AZP.

Los valores mínimos y máximos observados proporcionan la primera evidencia del impacto clínico de los tres esquemas terapéuticos, ya que en el caso del tratamiento que incorpora AZP, la amplitud abarca desde los 10 hasta los 20 días, menor a la observada en el tratamiento que incluye LPS_B, con una amplitud de 2 a 27 días, que a su vez es menor a lo observado en el tratamiento de sostén, cuyo intervalo se extiende desde los 3 hasta los 37 días.

Aunque a primera vista se observan diferencias entre los valores promedio, la más llamativa que surge de la interpretación de la estadística descriptiva es la correspondiente a los valores del CV entre los diferentes tratamientos (**Tabla 22**).

Los valores del CV fueron de 40,61% en el tratamiento de sostén, 67,18 en el tratamiento de control más LPS_B y 26,50 en el tratamiento de sostén más AZP.

Los resultados del testeo de la homocedasticidad de varianzas se presentan a continuación. En todos los casos el límite de significancia fue fijado en 5% ($p = 0,05$)

Resultado del test de F de homocedasticidad de varianzas

Los resultados de la comparación de varianzas entre los días de evolución desfavorable entre los grupos tratados con el tratamiento de sostén vs. tratamiento de sostén más LPS_B y entre los grupos tratados con el tratamiento de sostén vs. tratamiento de sostén más AZP se presentan en la **Tabla 23**.

Tratamiento de sostén vs. tratamiento sostén más LPS_B	
Estadístico de F = 1,424	p = 0,3014
El test de F sugiere que la diferencia entre varianzas de los dos tratamientos no es significativa.	
Tratamiento de sostén vs. tratamiento sostén más AZP	
Estadístico de F = 4,888	p = 0,0445
El test de F sugiere que la diferencia entre varianzas de los dos tratamientos es significativa.	

Tabla 23. Resultados de la comparación de varianzas de los días de evolución desfavorable entre los grupos tratados con el tratamiento de sostén vs. tratamiento de sostén más LPS_B y entre los grupos tratados con el tratamiento de sostén vs. tratamiento de sostén más AZP.

La dispersión de los datos experimentales expresados como días de evolución desfavorable presentó un patrón inverso a lo observado respecto del tiempo de recuperación favorable.

No se observó diferencias entre las varianzas de los tratamientos sostén y sostén más LPS_B; sin embargo la varianza de los datos obtenidos con el tratamiento sostén más AZP fue menor a la observada en el tratamiento testigo.

Estos resultados pueden ser comprendidos asumiendo que el curso de la enfermedad no se ve afectado en el tratamiento de sostén por la incorporación de LPS_B. En cambio el efecto de la adición de AZP lo afectó de manera notable, acortando la sobrevida de los pacientes y haciendo que el tiempo de desenlace presentara poca variación entre individuos, tal como se desprende de los valores mínimo y máximo del tiempo de evolución que osciló entre 10 y 20 días.

Asumiendo este hecho como desfavorable, proponemos que el efecto aditivo de la inmunosupresión causada por el virus de distemper canino y de la AZP tuvo un impacto negativo en la sobrevida de los pacientes debido al debilitamiento de la respuesta inmune, que se mostró incapaz de controlar la diseminación sistémica del virus a la vez que pudo haber facilitado el desarrollo de infecciones bacterianas intercurrentes.

Conclusiones

5. CONCLUSIONES

- Los signos clínicos de hipertermia, anorexia, secreciones oculares y respiratorios se presentaron en forma conjunta en más del 80% de los casos de distemper canino diagnosticados en la ciudad de Santa Fe y su zona de influencia durante el período comprendido entre los años 1998 y 2009.
- El único signo clínico de presencia en el 100% de los casos fue la hipertermia (39,5°C o mayor), mientras que la anorexia y la secreción ocular se presentaron en un 96,18 y 97,71% respectivamente.
- La frecuencia de presentación de signos respiratorios (disnea 84,73% y secreción nasal 88,55%) fue superior a la de los signos digestivos (vómitos 52,67% y diarrea 59,54%).
- Las pústulas se presentaron en el 73,28% de los casos, mientras que la almohadilla digital dura tuvo muy baja presentación (2,29%).
- Los signos nerviosos de diversa intensidad se presentaron en el 20,61% de los casos clínicos, mientras que en solo el 1,52% se produjo la muerte en ausencia de signos nerviosos.
- La frecuencia de presentación mensual durante el semestre diciembre-mayo fue baja con valores que fluctuaron entre el 2,46% y el 4,92%, produciéndose un incremento importante de la presentación clínica a partir de Junio (9,02%), hasta alcanzar el máximo valor en noviembre (22,95%).
- La mayor cantidad de diagnósticos se realizó durante las estaciones de invierno (33,61%) y primavera (34,43%).
- Los machos representaron el 63,08% de los casos clínicos, mientras que las hembras el 36,92%; la proporción de individuos de uno u otro sexo en relación a la casuística de la enfermedad se correspondería con la distribución de estas variables en la población y no a una mayor susceptibilidad de los machos a padecer la enfermedad.

- Un 40,00% de los diagnósticos se realizó en animales de gran porte, un 42,31% en animales medianos y el resto (17,69%) en animales de pequeño tamaño.

- La mayor frecuencia de presentación se observó en caninos menores a 2 años (73,64%), mientras que el porcentaje observado en adultos de hasta 10 años fue de 24,81% y en animales seniles de 1,55%.

- No se hallaron diferencias en los resultados de la evolución clínica observados entre los esquemas terapéuticos ensayados: tratamiento de sostén, tratamiento de sostén más LPS_B y tratamiento de sostén más AZP.

- La medida de la dispersión de los días de evolución favorable en cada uno de los tratamientos expresada como días máximos y mínimos y coeficiente de variación fueron: para el tratamiento de sostén de 7 y 48 días (CV: 35,20%). La incorporación de LPS_B redujo estos valores a 7 y 28 días (CV: 25,00%), mientras que la incorporación de AZP incrementó los mismos a 14 y 62 días (CV: 48,70%).

- La dispersión de los días de evolución desfavorable expresada como valores mínimos y máximos observados, no presentó diferencias entre los tratamientos de sostén (3 a 37 días; CV: 40,61%) y sostén más LPS_B (2 a 27 días; CV: 67,18%), por el contrario, la incorporación de AZP al tratamiento de sostén, redujo la misma a 10 y 20 días (CV: 26,50%).

Bibliografía

6. BIBLIOGRAFÍA

AIXELÁ, C. (2001). Efecto de la azatioprina en casos de moquillo canino. *Revista Clínica Veterinaria de Pequeños Animales*, 21(2). <http://www.avepa.org/cientifica/21-02/com02.htm>

ALLAN, P.W.; BENNETT, L.L. Jr (1971). 6-Methylthioguanilyc acid, a metabolite of 6-thioguanine. *Biochem. Pharmacol.* 20: 847-852.

ALLDINGER, S.; BAUMGÄRTNER, W.; ÖRVELL, C. (1993). Restricted expression of viral surface proteins in canine distemper encephalitis. *Acta Neuropathol.* 85: 635-645.

ALLDINGER, S.; WÜNSCHMANN, A.; BAUMGÄRTNER, W.; VOSS, C.; KREMMER, E. (1996). Up-regulation of major histocompatibility complex class II antigen expression in the central nervous system of dogs with spontaneous canine distemper virus encephalitis. *Acta Neuropathol.* 92: 273-280.

ALVING, C.R. (1993). Lipopolysaccharide, lipid A, and liposomes containing lipid A as immunologic adjuvants. *Immunobiology.* 187: 430-446

AMUDE, A.; ALFIERI, A. A.; ALFIERI, A. F. (2006). Clinicopathological findings in dogs with distemper encephalomyelitis presented without characteristic signs of the disease. *Res. Vet. Sc.* 82: 416-422.

APPEL, M. (1969). Pathogenesis of canine distemper. *A. J. Vet. Res.* 30: 1167-1182.

APPEL, M. (1970). Distemper pathogenesis in dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 156: 1681-1684.

APPEL, M. (1977). Canine distemper. In: Kirk, *Current Veterinary Therapy*. Ed. by Saunders. Philadelphia, pp. 1308-1313.

APPEL, M.; CARMICHAEL, L. (1979). Systemic viral diseases. In: Canine Medicine. Ed. by. Catcotte. American Veterinary Public. California. pp. 17-25.

APPEL, M.; SHEK, W.; SUMMERS, B. (1982). Lymphocyte-mediated immune cytotoxicity in dogs infected with virulent canine distemper virus. *Infect. Immun.* 37: 592-600.

APPEL, M.; MENDELSON, S.; HALL, W. (1984). Macrophage Fc receptors contro infectivity and neutralization of canine distemper virus-antibody complexes. *J. Virol.* 51: 643-649.

APPEL, M.; REGGIARDO, C.; SUMMERS, B.; PEARCE-KELLING, S.; MARÉ, C.; NOON, T.; REED, R.; SHIVELY, J.; ÖRVELL, C. (1991). Canine distemper virus infection and encephalitis in javelinás (collared peccaries). *Arch. Virol.* 119: 147-152.

APPEL, M.; YATES, R.; FOLEY, G.; BERNSTEIN, J.; SANTINELLI, S.; SPELMAN, L.; MILLER, L.; ARP, L.; ANDERSON, M.; BARR, M. (1994). Canine distemper epizootic in lions, tigers, and leopards in North America. *J. Vet. Diagn. Invest.* 6, 277-288.

APPEL, M.; SUMMERS, B. (1999). Canine Distemper: Current Status. En: Recent Advances in Canine Infectious Diseases. Carmichael L. Ed. International Veterinary Information Service. Ithaca, New York, United States of America. http://www.ivis.org/advances/Infect_Dis_Carmichael/appel/chapter_frm.asp?LA=1

BAUMGÄRTNER, W.; ÖRVELL, C.; REINACHER, M. (1989). Naturally occurring canine distemper virus encephalitis: distribution and expression of viral polypeptides in nervous tissues. *Acta Neuropathol.* 78: 504-512.

BAUMGÄRTNER, W.; ALLDINGER, S.; GAEDKE, K.; MORITZ, A. (1996). Metaphyseal osteosclerosis in young dogs with naturally occurring distemper. *Eur. J. Vet. Pathol.* 2: 23-32

BAUMGÄRTNER, W.; ALLDINGER, S. (2005). The pathogenesis of canine distemper virus induced demyelination – a biphasic process. In: *Experimental Models of Multiple Sclerosis*. Lavi, E.; Constantinescu, C.S. (Eds.). Springer, New York, pp. 871-887.

BEALE, K. M. (1988). Azathioprine for treatment of immune-mediated diseases of dogs and cats. *J.A.V.M.A.* 192: 1316-1318.

BEAN, R.H. (1962). The treatment of chronic ulcerative colitis with 6-mercaptopurine. *Med. J. Aust.* 49: 592-593.

BEINEKE, A.; PUFF, C.; SEEHUSEN, F.; BAUMGÄRTNER, W. (2009). Pathogenesis and immunopathology of systemic and nervous canine distemper. *Vet. Immunol. and Immunopathol.* 127: 1-18.

BERNARD, S.; SHEN, D.; GORHAM, J. (1982). Antigen requirements and specificity of enzyme-linked immunosorbent assay for detection of canine IgG against canine distemper viral antigens. *Am. J. Vet. Res.* 43: 2266-2269.

BLONDEAU, J. (2009). New concepts in antimicrobial susceptibility testing: the mutant prevention concentration and mutant selection window approach. *Vet. Dermatol.* 20: 383-396.

BRIGGS, G.G.; FREEMAN, R.K.; SUMNER, J.Y. (1990). *A Reference Guide to Fetal and Neonatal Risk, Drugs in Pregnancy and Lactation* (4th Ed.) Williams and Wilkins, London, 79-82.

BÜRGE, T.; GRIOT, C.; VANDEVELDE, M.; PETERHANS, E. (1989). Antiviral antibodies stimulate production of reactive oxygen species in cultured canine brain cells infected with canine distemper virus. *J. Virol.* 63: 2790-2797.

CAMMER, W.; BLOOM, B.; NORTEN, W.; GORDEN, S. (1978). Degradation of basic protein in myelin by neutral proteases secreted by stimulated macrophages: a

possible mechanism of inflammatory demyelination. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 75: 1554-1558.

CASWELL, J.; WILLIAMS, K. (2007). Respiratory system. In: Grant Maxie, M. (Ed.). *Jubb, Kennedy and Palmer's Pathology of Domestic Animals*. 5th. Edition. Elsevier Saunders, Edinburgh. London, New York, Oxford, Philadelphia, St Louis, Sydney, Toronto, pp. 635-636.

CHARLEY, B. (1986). Effects of immunopotentiating agents on alveolar macrophage properties. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 9: 155-159.

COULTHARD, S. A.; HOGARTH, L. A.; LITTLE, M.; MATHESON, E. C.; REDFERN, C. P.; MINTO, L.; HALL, A. G. (2002). The effect of thiopurine methyltransferase expression on sensitivity to thiopurine drugs. *Mol Pharmacol* 62: 102-109.

CURRAN, J.; KOLAKOFSKY, D. (2000). Replication of paramyxoviruses. *Adv. Virus Res.* 54: 403-422.

DERIJKS, L.J.; GILISSEN, L.P.; HOOYMANS, P.M.; HOMMES, D.W. (2006), Review article: thiopurines in inflammatory bowel disease. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 24: 715-729.

DIALLO, A. (1990). Morbillivirus group: genome organization and proteins. *Vet. Microbiol.* 23: 155-163.

DOLLERY, C. (1991). *Therapeutic Drugs, Volume 1*, Churchill, Livingstone, London, pp. 181-185.

DUBIELZIG, R.; HIGGINS, R.; KRAKOWKA, S. (1981). Lesions of the enamel organ of developing dog teeth following experimental inoculation of gnotobiotic puppies with canine distemper virus. *Vet. Pathol.* 18: 684-689.

ERNST, S.; METAYER, F.; HUBERT, A. (1987). Influencia de factores climáticos en la variabilidad de la prevalencia de algunas enfermedades infecciosas del canino. Arch. Med. Vet. 19: 13-19.

ERNST, S.; FÁBREGA, F. (1988). Metodología para el análisis de la distribución temporal de una enfermedad. Descomposición de una serie cronológica. Monog. Med. Vet. 10: 59-63.

FRISK, A.; KÖNIG, M.; MORITZ, A.; BAUMGÄRTNER, W. (1999). 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. 37: 3634-3643.

GAEDKE, K.; ZURBRIGGEN, A.; BAUMGÄRTNER, W. (1999). Lack of correlation between virus nucleoprotein and mRNA expression and the inflammatory response in demyelinating distemper encephalitis indicates a biphasic disease progress. Eur. Vet. Pathol. 5: 9-20.

GALLO CALDERON, M.; REMORINI, P.; PERIOLO, O.; IGLESIAS, M.; MATTION, N.; LA TORRE, J. (2007). Detection by RT-PCR and genetic characterization of canine distemper virus from vaccinated and non-vaccinated dogs in Argentina. Vet. Microbiol. 125: 341-349.

GARCÍA-HERNÁNDEZ, M.; GUERRERO-RAMÍREZ, G.; CASTRO-CORONA, M.; MEDINA-DE-LA-GARZA, C. (2009). Inmunomoduladores como terapia adyuvante en la enfermedad infecciosa. Medicina Universitaria 11: 247-259.

GERBER, J.; MARRON, A. (1976). Cell-mediated immunity and age at vaccination associated with measles inoculation and protection of dogs against canine distemper. Am. J. Vet. Res. 37: 133-138.

GREENE, C.; APPEL, M. (1998). Canine distemper. In: Infectious Diseases of the Dog and Cat. Greene, C.E. (Ed.). WB Saunders Company. Philadelphia, London, Toronto, Montreal, Sydney, Tokyo. Pp. 9-22.

GREENE, C.E.; APPEL, M.J. (2006). Canine distemper. In: Infectious Diseases of the dog and cat Greene C.E. (Ed.). 3rd ed. Saunders Elsevier, St Louis. Pp.25-41

GRÖNE, A.; ALLDINGER, S.; BAUMGÄRTNER, W. (2000). Interleukin-1beta, -6-12 and tumor necrosis factor-alfa expression in brains of dogs with canine distemper virus infection. *J. Neuroimmunol.* 110: 20-30.

GRÖNE, A.; DOHERR, M.; ZURBRIGGEN, A. (2004). Canine distemper virus infection of canine footpad epidermis. *Vet. Dermatol.* 15: 159-167.

HAAS, L.; MARTENS, W.; GREISER-WILKE, I.; MAMAIEV, L.; BUTINA, T.; MAACK, D.; BARRET, T. (1997). Analysis of the haemagglutinin gene of current wild-type canine distemper virus isolates from Germany. *Virus Res.* 48: 165-171.

HANAUER, S.B.; SANDBORN, W. (2001). Management of Crohn's disease in adults. *Am. J. Gastroenterol.* 96: 635-643.

HEADLEY, S.; GRAÇA, D. (2000). Canine distemper: epidemiological findings of 250 cases. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.* 37:(2) 136-140.

HIGGINS, R.; CHILD, G.; VANDEVELDE, M. (1988). Chronic relapsing demyelinating encephalomyelitis associated with persistent spontaneous canine distemper virus infection. *Acta Neuropathol (Berl)* 77: 441-444.

HO, C.; BABIUK, L. (1979). Immune mechanisms against canine distemper. II. Role of antibody in antigen modulation and prevention of intercellular and intracellular spread of canine distemper virus. *Immunology* 38: 765-772.

HO, C.; BABIUK, L. (1980). Immune mechanisms against canine distemper. III. Role of complement lysis in the immunity and persistent infection of canine distemper virus. *Immunology* 39: 231-237.

HOOVER, S.; STRIKER, R. (2006). Thiopurines inhibit bovine viral diarrhea virus production in a thiopurine methyltransferase-dependent manner. *J. Gen. Virol.* 89: 1000-1009.

HOUSTON, D. M.; TAYLOR, J. A. (1991) Acute pancreatitis and bone marrow suppression in a dog given azathioprine. *Can. Vet. J.* 32: 496-497.

JACOBS, D.M. (1981). Immunomodulatory effects of bacterial lipopolysaccharide. *J. Immunopharmacol.* 3: 119-132.

JANEWAY, C.; MEDZHITOV, R. (2002). Innate immune recognition. *Annu. Rev. Immunol.* 20: 197-216.

JOHNSON, A.G.; GAINES, S.; LANDY, M. (1956). Studies on the O antigen of *Salmonella typhosa*. V. Enhancement of antibody response to protein antigens by the purified lipopolysaccharide. *Exp. Med.* 103: 225-246.

JOHNSON, G.; FENNER, W.; KRAKOWKA, S. (1988). Production of immunoglobulin G and increased antiviral antibody in cerebrospinal fluid of dogs with delayed-onset canine distemper viral encephalitis. *J. Neuroimmunol.* 17: 237-251.

KIDD, L. B.; SALAVAGGIONE, O. E.; SZUMLANSKI, C. L.; MILLER, J. L.; WEINSHILBOUM, R. M.; TREPANIER, L. (2004). Thiopurine methyltransferase activity in red blood cells of dogs. *J. Vet. Int. Med.* 18: 214-218.

KORNBLUTH, A.; SACHAR, D.B. (1997). Ulcerative colitis practice guidelines in adults. American College of Gastroenterology, Practice Parameters Committee. *Am. J. Gastroenterol.* 92: 204-211.

KOUTINAS, A.; BAUMGÄRTNER, W.; TONTIS, D.; POLIZOPOULOU, Z.; SARIDOMICHELAKIS, M.; LEKKAS, S. (2004). Histopathology and immunohistochemistry of canine distemper virus-induced footpad hyperkeratosis (hard pad disease) in dogs with natural canine distemper. *Vet. Pathol.* 41: 2-9.

KRAKOWKA, S.; COCKERELL, G.; KOESTNER, A. (1975). Effects of canine distemper virus infection on lymphoid functions in vitro and in vivo. *Infect. Immun.* 11: 1069-1078.

KRAKOWKA, A.; HOOVER, E.; KOESTNER, A.; KETRING, K. (1977). Experimental and Naturally Occurring Transplacental Transmission of Canine Distemper Virus. *Am. J. Vet. Res.* 38: 919-922.

KRAKOWKA, S.; HIGGINS, R.; KOESTNER, A. (1980). Canine distemper virus: review of structural and functional modulations in lymphoid tissues. *Am. J. Vet. Res.* 41: 284-292

KRAKOWKA, S.; AXTHEL, M.; JOHNSON, G. (1985). Canine distemper virus. In: *Comparative Pathobiology of Viral Diseases*. Olsen, R., Krakowka, S., Blakeslee, J. R. (Eds.). Vol. 2. CRC Press. Boca Raton. Pp. 137-164.

KRAKOWKA, S. (1989). Canine distemper virus infectivity of various blood fractions for central nervous system vasculature. *J. Neuroimmunol.* 21: 75-80.

KRAKOWKA, S.; KOESTNER, A. (1997). Comparison of canine distemper virus strains in gnotobiotic dogs: effects on lymphoid tissues. *Am. J. Vet. Res.* 38, 1919-1922.

KRENSKY, A.M.; VINCENTI, F.; BENNETT, W.M. (2007). Inmunosupresores, tolerógenos e immunoestimulantes. En: *Goodman & Gilman. Las bases farmacológicas de la terapéutica*. 11 Ed. Brunton, L.L.; Lazo, J.S; Parker, K.L., Eds. Colombia. McGraw-Hill Interamerinaca;

KRISTENSEN, B.; VANDEVELDE, M. (1978). Immunofluorescence studies of canine distemper encephalitis on paraffin-embedded tissue. *Am. J. Vet. Res.* 39: 1017-1021.

LAMB, R. A.; KOLAKOFSKY. (2001). Paramyxoviridae: the viruses and their replication. In: *Fields of Virology*, 4th ed., vol. 1. Knipe, D. M.; Howley, P. M. (Eds.). Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, pp. 1305-1443.

LAN, N.; YAMAGUCHI, R.; FURUYA, Y.; INOMATA, A.; NGAMKALA, S.; NAGANOBU, K.; KAI, K.; MOCHIZUKI, M.; KOBAYASHI, Y.; UCHIDA, K.; TATEYAMA, S. (2005). Pathogenesis and phylogenetic analyses of canine distemper virus strain 007Lm, a new isolate in dogs. *Vet. Microbiol.* 110: 197-207.

LANDEROS, L. (1988). Estudio retrospectivo de diagnósticos caninos en una clínica veterinaria del Gran Santiago, 1981-1985. Tesis Médico Veterinario. Universidad de Chile, Facultad de Medicina Veterinaria, 98 pp.

LENNARD, L. (1992). The clinical pharmacology of 6-mercaptopurine. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 43: 329-339.

LIN, S.N.; JESSUP, K.; FLOYD, M.; WANG, T.P.; VAN BUREN, C.T.; CAPRIOLI, R.M.; KAHAN, B.D. (1980). Quantitation of plasma azathioprine and 6-mercaptopurine levels in renal transplant patients. *Transplantation*, 29: 290-294.

LING, Y. H.; CHAN, J. Y.; BEATTIE, K. L.; NELSON, J. A. (1992). Consequences of 6-thioguanine incorporation into DNA on polymerase, ligase, and endonuclease reactions. *Mol. Pharmacol.* 42: 802-807.

LÖFFLER, S.; LOTTSPEICH, F.; LANZA, F.; AZORSA, D.; ter MEULEN, V.; SCNEIDER-SCHAULIES, J. (1997). CD9, a tetraspan transmembrane protein, renders cells susceptible to canine distemper virus. *J. Virol.* 71: 42-49.

MARSHALL, N.E.; ZIEGLER, H.K. (1989). Role of lipopolysaccharide in induction of Ia expression during infection with gram-negative bacteria. *Infect. Immun.* 57:1556-1560.

MARTÍNEZ MANRIQUE, C.E. (2005). Modulación de la respuesta Inmune. *Tendencias vigentes. Medisan.* 9: 3.

MASIHI K.N. (2001). Fighting infection using immunomodulatory agents. *Expert Opin. Biol. Ther.* 1: 641-653.

McCULLOUGH, S.; McNEILLY, F.; ALLAN, G.; KENNEDY, S.; SMYTH, S.; COSBY, S.; McQUAID, S.; RIMA, B. (1991). Isolation and characterization of a porpoise morbillivirus. *Arch. Virol.* 118: 247-252.

McEVOY, G. (1993) *Drug Information The American Hospital Formulary Service*, American Society of Health-System Pharmacists, Inc.

METAYER, F. (1986) Factores de riesgo en la ocurrencia de enfermedades infecciosas en caninos: distemper, hepatitis y leptospirosis diagnosticadas en la Clínica de Pequeños Animales del Hospital Veterinario de la Universidad Austral de Chile. Tesis. Facultad de Ciencias Veterinarias Universidad Austral de Chile. Valdivia. Chile.

MIELE, J.; KRAKOWKA, S. (1983). Antibody responses to virion polypeptides in gnotobiotic dogs infected with canine distemper virus. *Infect. Immun.* 41: 869-871.

MONTGOMERY, D. (1994). Astrocytes: form, functions, and roles in disease. *Vet. Pathol.* 31: 145-167.

MORALES, M.; URCELAY, S.; NÚÑEZ, F.; VILLALOBOS, S. (1993). Caracterización de la población canina y sus cambios en la comuna de Santiago. *Avances en Ciencias Veterinarias.* 8: 29-32.

MORALES, M.; MORA, L.; SALAZAR, J. (1997). Distemper canino: sobrevida por edad, sexo, raza y estación. *Avances en Ciencias Veterinarias.* 12: 41-44.

MORI, T.; SHIN, Y.; OKITA, M.; HIRAYAMA, N.; MIYASHITA, N.; GEMMA, T.; KAI, C.; MIKAMI, T. (1994). The biological characterization of field isolates of canine distemper virus from Japan. *J. Gen. Virol.* 75: 2403-2408.

MORITZ, A.; FRISK, A.; BAUMGÄRTNER, W. (2000). The evaluation of diagnostic procedures for the detection of canine distemper virus infection. *Eur. J. Comp. Anim. Pract.* 10: 37-47.

MORO, L.; de SOUSA MARTINS, A.; de MORAES ALVES, C.; de ARAUJO SANTOS, F.; dos SANTOS NUNES, J.; CARNEIRO, R.; CARVALHO, R.; VASCONCELOS, A. (2003). Apoptosis in canine distemper. Arch. Virol. 148: 153-164.

MULCAHY, G.; QUINN, P.J. (1986). A review of immunomodulators and their application in veterinary medicine. J. Vet. Pharmacol. Ther. 2:119-139.

NEFJEES, J. (1993) Cell biology of antigen presentation. Curr. Op. Immunol. 5: 27-34.

NESSELER, A.; BAUMGÄRTNER, W.; GAEDKE, K.; ZURBRIGGEN, A. (1999). Restricted virus protein translation in canine distemper virus inclusion body poliioencephalitis. Vet. Microbiol. 69: 23-28.

NORIMATSU, M.; OGIKUBO, Y.; KOJIMA, A.; TAKAHASHI, T.; WATANABE, G.; TAYA, K.; SASAMOTO, S.; TAMURA, Y. (1995). Effects of oil adjuvant on systemic response to Escherichia coli lipopolysaccharide in swine. J. Vet. Med. Sci. 57: 1089-1091.

OGILVIE, G. K.; FELSBURG, P, J.; HARRIS, C. W. (1988). Short-term effect of cyclophosphamide and azathioprine on selected aspects of the canine blastogenic response. Vet. Immunol. Immunopathol. 18: 119-127.

OKITA, M.; YANAI, T.; OCHIKUBO, F.; GEMMA, T.; MORI, T.; MASEKI, T.; YAMANOUCHI, K.; MIKAMI, T.; KAI, C. (1997). Histopathological features of canine distemper recently observed in Japan. J. Comp. Pathol. 116: 403-408.

ORLANDO, E.; IMBSCHWEILER, I.; GERHAUSER, I.; BAUMGÄRTNER, W.; WEWETZER, K. (2008). *In vitro* characterization and preferential infection by canine distemper virus of glial precursors with Schwann cell characteristics from adult canine brains. Neuropathol. Appl. Neurobiol. 34: 621-637.

ÖRVELL, C. (1980). Structural polypeptides of canine distemper virus. Arch. Virol. 66: 193-206.

PANG, G.; COUCH, L.; BATEY, R.; CLANCY, R.; CRIPPS, A. (1994). GM-CSF, IL-1 alpha, IL-1 beta, IL-6, IL-8, IL-10, ICAM-1 and VCAM-1 gene expression and cytokine production in human duodenal fibroblasts stimulated with lipopolysaccharide, IL-1 alpha and TNF-alpha. *Clin Exp Immunol.* 96: 437-443.

PARDO, I.; JOHNSON, G.; KLEIBOEKER, S. (2005). Phylogenetic characterization of canine distemper viruses detected in naturally infected dogs in North America. *J. Cl. Microbiol.* 43: 5009-5017.

PEREZ, A.; MARRO, V.; SCHIAFFINO, L.; PIRLES, M.; BIN, L.; WARD, M. (2003). Factores de riesgo asociados con casos clínicos de moquillo canino en Casilda, Santa Fe. *InVet.* 5: 75-81.

POTGIETER, L.; AJIDAGBA, P. (1989). Quantitation of canine distemper virus and antibodies by enzyme-linked immunosorbent assays using protein A and monoclonal antibody capture. *J. Vet. Diagn. Invest.* 1: 110-115.

PRESENT, D.H.; KORELITZ, B.I.; WISCH, N.; GLASS, J.L.; SACHAR, D.B.; PASTERNAK, B.S. (1980) Treatment of Crohn's disease with 6-mercaptopurine. A long-term, randomized, double-blind study. *N. Engl. J. Med.* 302: 981-987.

QUINN, P.J. (1990) Mechanism of actions of some immunomodulators used in veterinary medicine. *Adv. Vet. Sci. Comp. Med.* 35: 43-99.

REDDY, P.G. (1990) Nutritional modulation of immunity in domestic food animals. *Adv. Vet. Sci. Com. Med.* 35: 255-281.

REMUZZI, G.; LESTI, M.; GOTTI, E.; GANEVA, M.; DIMITROV, B.; ENEIORDACHE, B.; GHERARDI, G.; DONATI, D. (2004). "Mycophenolate mofetil versus azathioprine for prevention of acute rejection in renal transplantation (MYSS): a randomised trial". *The Lancet* 364: 503-512.

REUTEMANN, S.; GOLLÁN, A.; PINOTTI, M.; OCCHI, H. (2006). Distemper canino: Detección por inmunofluorescencia directa (IFD) y recuperación de cepas circulantes. Encuentro de Jóvenes Investigadores Universidad Nacional del Litoral.

RIMA, B.; DUFFY, N.; MITCHELL, W.; SUMMERS, B.; APPEL, M. (1991). Correlation between humoral immune responses and presence of virus in the CNS in dogs experimentally infected with canine distemper virus. Arch. Virol. 121: 1-8.

RINKARDT, N. E.; KRUTH, S. A.; KAUSHIK, A. (1999). The effects of prednisone and azathioprine on circulating immunoglobulin levels and lymphocyte subpopulations in normal dogs. Can. J. Vet. Res. 63: 18-24.

ROLKE-PARKER, M.; MUNSON, M.; PACKER, C.; KOCH, R.; CLEAVELAND, S.; CARPENTER, M.; O'BRIEN, S.; POSPISCHIL, A.; HOFMANN-LEHMANN, R.; LUTZ, H. (1996). A canine distemper virus epidemic in *Serengeti lions* (*Panthera leo*). Nature 379: 441-445.

RUDD, P., CATTANEO, R.; VON MESSILING, V. (2006). Canine Distemper virus uses both the anterograde and the hematogenous pathway for neuroinvasion. J. Virol. 80: 9361-9370.

SAHASRANAMAN, S.; HOWARD, D.; ROY, S. (2008). Clinical pharmacology and pharmacogenetics of thiopurines. Eur. J. Clin. Pharmacol. 64: 753-767.

SAJID, M.S.; IQBAL, Z.; MUHAMMAD, G.; IQBAL, M.U. (2006). Immunomodulatory effect of various anti-parasitics: a review. Parasitology. 132: 301-313.

SANDERS, V.M.; FUCHS, B.A.; PRUETT, S.B.; KERKVLIT, N.I.; KAMINSKI, N.E. (1991). Symposium on indirect mechanisms of immune modulation. Fundam. Appl. Toxicol. 17: 641-650.

SARFATY, D.; CARRILLO, J.; GREENLEE, P. (1986). Differential diagnosis of granulomatous meningoencephalomyelitis, distemper and suppurative meningoencephalitis in the dog. J. Am. Vet. Med. Assoc. 188: 387-392.

SCAGLIARINI, A.; BATTILANI, M.; CIULLUS, S.; PRÓSPERI, S.; MORGANTI, L. (2003). Molecular analysis of the NP gene of Italian canine distemper virus isolates. *Vet. Res. Commun.* 27: Suppl. 1. 355-357.

SCHOBESBERGER, M.; ZURBRIGGEN, A.; DOHERR, M.; WEISSENBÖCK, H.; VANDEVELDE, M.; LASSMANN, H.; GRIOT, C. (2002). Demyelination precedes oligodendrocyte loss in canine distemper virus-induced encephalitis. *Acta Neuropathol.* 103: 11-19.

SINGH, J.; SIDHU, S.S.; DHALIWAL, G.S.; PANGAONKAR, G.R.; NANDA, A.S.; GREWAL, A.S. (2000). Effectiveness of lipopolysaccharide as an intrauterine immunomodulator in curing bacterial endometritis in repeat breeding cross-bred cows. *Anim. Reprod. Sci.* 59:159-166.

SPENCER, H.; STRIKER, R. (2008). Thiopurines inhibit bovine viral diarrhea virus production in a thiopurine methyltransferase-dependent manner. *J. Gen. Virol.* 89: 1000-1009.

STANGL, J. R.; CARROLL, K. L.; ILLICHMANN, M.; STRIKER, R. (2004). Effect of antimetabolite immunosuppressants on Flaviviridae, including hepatitis C virus. *Transplantation* 77: 562-567.

STEIN, V.; CZUB, M.; SCHREINER, N.; MOORE, P.; VANDEVELDE, M.; ZURBRIGGEN, A.; TIPOLD, A. (2004). Microglial cell activation in demyelinating canine distemper lesions. *J. Neuroim.* 153: 122-131.

STEIN, V.; SCHREINER, N.; MOORE, P.; VANDEVELDE, M.; ZURBRIGGEN, A.; TIPOLD, A. (2008). Immunophenotypical characterization of monocytes in canine distemper virus infection. *Vet. Microbiol.* 131: 237-246.

SUMMERS, B.; GREISEN, H.; APPEL, M. (1979). Early events in canine distemper demyelinating encephalomyelitis. *Acta Neuropathol.* 46: 1-10.

SUMMERS, B.; GREISEN, H.; APPEL, M. (1984). Canine distemper encephalomyelitis: an ultrastructural analysis. *J. Neurocytol.* 16: 871-881.

SUNWOO, H.; NAKANO, T.; DIXON, W. and SIM, J. (1996) Immune responses in chickens against lipopolysaccharide of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Poultry Science.* 75: 342-345.

SWANN, P.F.; WATERS, T.R.; MOULTON, D.C.; XU, Y.Z.; ZHENG, Q.; EDWARDS, M.; MACE, R. (1996). Role of postreplicative DNA mismatch repair in the cytotoxic action of thioguanine. *Science* 273: 1109-1111.

SXHWARTZ, R. (2003) Diversity of the immune repertoire and immune regulation. *N Engl J Med*, 348: 1017-1026.

TATSUO, H.; YANAGI, Y. (2002). The morbillivirus receptor SLAM (CD150). *Microbiol. Immunol.* 46: 135-142.

TAY, B.S.; LILLEY, R.M.; MURRAY, A.W.; ATKINSON, M.R. (1969). Inhibition of phosphoribosyl pyrophosphate amidotransferase from Ehrlich ascites-tumour cells by thiopurine nucleotides. *Biochem. Pharmacol.* 18: 936-938.

TEML, A.; SCHAEFFELER, E.; HERRLINGER, K.R.; KLOTZ, U.; SCHWAB, M. (2007). Thiopurine treatment in inflammatory bowel disease: clinical pharmacology and implication of pharmacogenetically guided dosing. *Clin. Pharmacokinet.* 46: 187-208.

TIPOLD, A.; MOORE, P.; ZURBRIGGEN, A.; BURGNER, I.; BARBEN, G.; VANDEVELDE, M. (1999). Early T cell response in the central nervous system in canine distemper virus infection. *Acta Neuropathol.* 97: 45-56.

TIZARD, I. (2009). La defensa del organismo. En: *Introducción a la Inmunología Veterinaria*, Tizard, I. (Ed.). Elsevier, Barcelona, España. Pp 1-10.

TSAI, S.; SUMMERS, B.; APPEL, M. (1982). Interferón in cerebrospinal fluid. A marker for viral persistence of canine distemper encephalomyelitis. *Arch. Virol.* 72: 257-265.

VANDEVELDE, M.; ZURBRIGGEN, A.; HIGGINS, R.; PALMER, D. (1985). Spread and distribution of viral antigen in nervous canine distemper. *Acta Neuropathol.* 67: 211-218.

VANDEVELDE, M.; ZURBRIGGEN, A.; STECK, A.; BICHSEL, P. (1986). Studies on the intrathecal humoral immune response in canine distemper encephalitis. *J. Neuroimmunol.* 11: 41-51.

VANDEVELDE, M. (2004). The pathogenesis of nervous distemper. *Vet. Sc. Tom.* 1-5

VANDEVELDE, M.; ZURBRIGGEN, A. (2005). Demyelination in canine distemper virus infection: a review. *Acta Neuropathol.* 109: 56-68.

VERMA, J.N.; RAO, M.; AMSELEM, S.; KRZYCH, U.; ALVING, C.R.; GREEN, S.J.; WASSEF, N.M. (1992). Adjuvant effects of liposomes containing lipid A: enhancement of liposomal antigen presentation and recruitment of macrophages. *Infect. Immun.* 60: 2438-2444.

VOGT, M. H.; STET, E. H.; DE ABREU, R. A.; BOKKERINK, J. P.; LAMBOOY, L. H.; TRIJBELS, F. J. (1993). The importance of methylthio-IMP for methylmercaptapurine ribonucleoside (Me-MPR) cytotoxicity in Molt F4 human malignant T-lymphoblasts. *Biochim. Biophys. Acta* 1181: 189-194.

VON MESSLING, V.; SPRINGFELD, C.; DEVAUX, P.; CATTANEO, R. (2003). A ferret model of canine distemper virus virulence and immunosuppression. *J. Virology*, 77: 12579-12591.

VON MESSLING, V.; MILOSEVIC, D.; CATTANEO, R. (2004). Tropism illuminated: lymphocyte-based pathways blazed by lethal morbillivirus through the host immune system. *P. Natl. Acad. Sci.* 101: 14216-14221

VON MESSLING, V.; SVITEK, N.; CATTANEO, R. (2006). Receptor (SLAMF7[CD150]) recognition and the V protein sustain swift lymphocyte-based invasion of mucosal tissue and lymphatic organs by a morbillivirus. *J. Virol.* 80: 6084-6092.

WARREN, H.S., VOGEL, F.R.; CHEDID, L.A. (1986). Current status of immunological adjuvants. *Annu. Rev. Immunol.* 4: 369-388.

WENZLOW, N.; PLATTET, P.; WITTEK, R.; ZURBRIGGEN, A.; GRÖNE, A. (2007). Immunohistochemical demonstration of the putative canine distemper virus receptor CD150 in dogs with and without distemper. *Vet. Pathol.* 44: 943-948.

WOODROFFE, R.; YAO, G.; MEADS, C.; BAYLISS, S.; READY, A.; RAFTERY, J.; TAYLOR, R. (2005). "Clinical and cost-effectiveness of newer immunosuppressive regimens in renal transplantation: a systematic review and modelling study". *Health Technol Assess* 9: 1-194.

WRIGHT, N.; CORNWELL, A.; THOMPSON, H.; LAUDER, I. (1974). Canine distemper: current concepts in laboratory and clinical diagnosis. *Vet. Rec.* 94: 86-92.

WÜNSCHMANN, A.; ALLDINGER, S.; KREMMER, E.; BAUMGÄRTNER, W. (1999). Identification of CD4⁺ and CD8⁺ cell subsets and B cells in the brain of dogs with spontaneous acute, subacute-, and chronic-demyelinating distemper encephalitis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 67: 101-116.

WÜNSCHMANN, A.; KREMMER, E.; BAUMGÄRTNER, W. (2000). Phenotypical characterization of T and B cells areas in lymphoid tissues of dogs with spontaneous distemper. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 73: 83-98.

YOSHIKAWA, Y.; OCHIKUBO, F.; MATSUBARA, Y.; TSURUOKA, H.; ISHII, M.; SHIROTA, K.; NOMURA, W.; SUGIYAMA, M.; YAMANOUCHI, K. (1989).

Natural infection with canine distemper virus in a Japanese monkey (*Macaca fuscata*). *Vet. Microbiol.* 20: 193-205.

ZHAO, J.; YAN, X.; WU, W. (2008). Genetic variations and cellular receptors of canine distemper virus. A review. *Wei Sheng Wu Xue Bao* 48: 986-991.

ZURBRIGGEN, A.; GRABER, H.; VANDEVELDE, M. (1995). Canine distemper virus persistence in the nervous system is associated with noncytolytic selective virus spread. *J. Virol.* 69: 1678-1686.