

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
FACULTAD DE AGRONOMÍA  
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA



TESIS

ANÁLISIS GENÉTICO Y FILOGENÉTICO DEL GEN DE LA  
HEMAGLUTININA DEL VIRUS DEL DISTEMPER CANINO (VDC) DE  
CEPAS QUE CIRCULAN EN EL ÁREA METROPOLITANA  
DE MONTERREY, N.L.

PRESENTADA POR

MVZ ANA BELEM GONZÁLEZ LINARES

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRÍA EN CIENCIA ANIMAL

NOVIEMBRE, 2015

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
FACULTAD DE AGRONOMÍA  
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA  
POSGRADO CONJUNTO



TESIS

ANÁLISIS GENÉTICO Y FILOGENÉTICO DEL GEN DE LA  
HEMAGLUTININA DEL VIRUS DEL DISTEMPER CANINO (VDC) DE  
CEPAS QUE CIRCULAN EN EL ÁREA METROPOLITANA DE  
MONTERREY, N.L.

PRESENTADA POR

MVZ ANA BELEM GONZÁLEZ LINARES

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRÍA EN CIENCIA ANIMAL

GRAL.ESCOBEDO NUEVO LEÓN, MÉXICO

NOVIEMBRE 2015

**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON**  
**POSGRADO CONJUNTO AGRONOMIA-VETERINARIA**



**ANÁLISIS GENÉTICO Y FILOGENÉTICO DEL GEN DE LA HEMAGLUTININA DEL  
VIRUS DEL DISTEMPER CANINO (VDC) DE CEPAS QUE CIRCULAN EN EL ÁREA  
METROPOLITANA DE MONTERREY, N.L.**

Aprobación de tesis por el comité particular de  
MVZ. Ana Belem González Linares

Dr. Ramiro Avalos Ramírez.  
Director de Tesis

Dr. Ricardo Canales del Castillo  
Director externo de Tesis

Dra. Diana Elisa Zamora Ávila  
Co-director de Tesis

Dra. Sibilina Cedillo Rosales  
Co-director de Tesis

GRAL.ESCOBEDO N.L. MEXICO

NOVIEMBRE 2015

## **AGRADECIMIENTOS**

A mis compañeros de maestría, cómplices de esta aventura juntos llegamos a la meta, gracias por dejarme conocerlos y encontrar amistades verdaderas y duraderas.

A mis queridas Ponys de la suerte, compañeras y amigas juntas conocimos muchas cosas nuevas y nos motivamos día con día para recorrer este largo camino juntas, las quiero!

A Samady que siempre tuvo una palabra de apoyo en los momentos de flaqueza demostrando su sincera amistad y su apoyo incondicional.

A Diana, por todo el apoyo hacia mí y recordarme que puedo aun confiar, por ser simplemente mi amiga.

A mi director de tesis, Dr. Ramiro porque me enseñó que los resultados solo llegan con esfuerzo y dedicación, por ser el mejor maestro y por la paciencia que me tuvo estos dos años, nunca me dejó rendirme, y por todo ese conocimiento que se ve reflejado en este trabajo, le agradezco inmensamente siempre ver la manera de que no faltara material para mi trabajo, muchas gracias jefe.

A mi director externo, Dr. Canales quien me ayudó con toda la bioinformática de mi trabajo gracias por su tiempo, sinceramente no lo hubiera logrado sin su ayuda.

A Cinthia, por siempre brindar una sincera sonrisa y estar siempre en la disposición de ayudar en cualquier cosa que me faltara o compartir su experiencia conmigo.

A Leslee por tu dedicación a enseñarme todas las cosas necesarias para llevar acabo mi trabajo, por toda tu ayuda, por hacer de mis resultados los tuyos.

A todos mis maestros de posgrado, quienes nos enseñaron con paso a paso a recorrer este camino, algunos caminos fáciles, otros no tanto.

A la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia por abrirme sus instalaciones para poder hacer realidad este sueño.

Al posgrado conjunto Agronomía-Veterinaria por su confianza para ingresar a su plan de estudios.

A CONACYT, gracias por el apoyo a estudiantes, para seguir creciendo como personas y profesionistas.

## **DEDICATORIA**

A Dios padre que nunca me abandono, me hizo fuerte para terminar lo que dos años atrás comencé.

A mi esposo Piano, por ser mi compañero, consejero y amigo a lo largo de estos dos años, siempre tuvo una palabra de aliento, por no dejarme caer en ningún momento por todo ese amor, gracias flaquito.

A mis hijas por sacarme siempre sonrisas, por ser mi motor, por no hacerme fácil este camino simplemente por ser quien son.

A mi madre, que siempre estuvo en los momentos más difíciles siendo un pilar en mi vida.

A mi hermano, gracias por las flores.

A mi mejor amigo que está en el cielo.

## **INDICE DE CONTENIDO**

AGRADECIMIENTOS -----	<b>iii</b>
DEDICATORIA -----	<b>v</b>
INDICE DE TABLAS -----	<b>x</b>
INDICE DE FIGURAS -----	<b>xi</b>
NOMENCLATURA -----	<b>xii</b>
RESUMEN -----	<b>xiii</b>
1. INTRODUCCIÓN-----	<b>1</b>
1.1. Objetivos -----	<b>4</b>
1.1.1. Objetivo general -----	<b>4</b>
1.1.2. Objetivos específicos -----	<b>4</b>
1.2. Hipótesis -----	<b>5</b>
1.3. Justificación-----	<b>5</b>
2. REVISION DE LITERATURA -----	<b>6</b>
2.1.Características virales -----	<b>6</b>
2.2. Proteínas virales -----	<b>6</b>
2.2.1. Nucleocápside (N) -----	<b>6</b>
2.2.2. Fosfoproteína (P) -----	<b>7</b>
2.2.3. Proteína de Matriz (M) -----	<b>7</b>
2.2.4. Proteína de Fusión (F) -----	<b>8</b>
2.2.5. Hemaglutinina (H) -----	<b>9</b>
2.2.6 Proteína Grande (G) -----	<b>9</b>
2.3. Replicación viral -----	<b>10</b>

2.4. Patogénesis -----	11
2.5. Manifestaciones clínicas-----	13
2.6. Hospedadores -----	15
2.7. Lesiones -----	17
2.8. Diagnóstico -----	17
2.9. Tratamiento -----	18
2.10. Prevención y control -----	18
2.11. Variabilidad genética -----	19
2.12. N-Glicosilación -----	22
2.13. Selección natural -----	22
3. MATERIAL Y MÉTODOS -----	24
3.1. Material -----	24
3.1.1. Equipos -----	24
3.1.2. Material biológico -----	24
3.1.3. Reactivos y estuches comerciales -----	25
3.1.4. Reactivos y consumibles para la extracción de ARN a partir de muestras clínicas -----	25
3.1.5. Reactivos y consumibles de RT-PCR, PCR y electroforesis -----	25
3.2. Metodología de la investigación -----	26
3.2.1. Lugar de trabajo -----	26
3.2.2. Obtención y tipos de muestras -----	26
3.2.3. Extracción de ácidos nucleicos (ARN) -----	27
3.2.3.1. Extracción de ARN a partir de órganos, hisopado nasal e hisopado	

conjuntival -----	27
3.2.4. Reacción en cadena de polimerasa (PCR) -----	28
3.2.4.1. Controles positivos y negativos -----	29
3.2.5. RT-PCR -----	29
3.2.5.1. RT-PCR y PCR para el Diagnóstico del virus Distemper canino -----	29
3.2.6. PCR punto final -----	30
3.2.6.1. PCR Anidado para el diagnóstico del virus Distemper canino -----	30
3.2.6.2. RT-PCR Y PCR para amplificación del gen de la Hemaglutinina -----	31
3.2.6.3. Diseño de oligonucleótidos -----	32
3.2.6.4. PCR anidado para la amplificación de un fragmento del gen de la Hemaglutinina -----	32
3.2.7. Electroforesis -----	34
3.2.8. Secuenciación -----	34
3.2.9. Análisis de Bioinformática -----	37
3.2.9.1. Edición de secuencias parciales del gen de la Hemaglutinina-----	37
3.2.9.2. Análisis filogenético -----	38
3.2.9.3. Sitios potenciales de glucosilación -----	38
3.2.9.4. Análisis de presiones selectivas -----	38
4. RESULTADOS -----	39
4.1. RT-PCR y PCR anidado para el diagnóstico del virus Distemper canino -----	39
4.2. RT-PCR y PCR para la amplificación del gen de la Hemaglutinina -----	39
4.3. PCR anidado para la amplificación de fragmento del gen de la Hemaglutinina -	40
4.4. Análisis filogenético -----	41

4.4.1. Análisis del gen parcial de la Hemaglutinina -----	<b>41</b>
4.4.2. Análisis para la detección y ubicación de los potenciales sitios de glucosilación -----	<b>45</b>
4.4.3. Presiones selectivas -----	<b>45</b>
5. DISCUSIÓN -----	<b>51</b>
6. CONCLUSIÓN -----	<b>56</b>
7. BIBLIOGRAFÍA -----	<b>57</b>

## INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Descripción las familias y especies afectadas por el VDC -----	<b>16</b>
Tabla 2. Descripción de los oligonucleótidos utilizados para el diagnóstico y filogenia del VDC en el área metropolitana de Monterrey Nuevo León México ----	<b>33</b>
Tabla 3. Secuencias nucleotídicas utilizadas en los análisis filogenéticos -----	<b>34</b>
Tabla 4. Análisis de distancia nucleotídica de las secuencias de los 12 linajes del VDC -----	<b>43</b>
Tabla 5. Análisis de distancia nucleotídica de los aislados de esta investigación ----	<b>43</b>
Tabla 6. Análisis de distancia aminoácídica de las secuencias de los 12 linajes del VDC -----	<b>44</b>
Tabla 7. Análisis de distancia aminoácídica de los aislados de esta investigación ---	<b>44</b>
Tabla 8. Análisis de presiones selectivas -----	<b>45</b>

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Signos clínicos característicos de la infección causada por el virus Distemper canino -----	<b>15</b>
Figura 2. Árbol filogenético de las secuencias completas del gen de la Hemaglutinina de VDC -----	<b>20</b>
Figura 3. Árbol filogenético entre 72 cepas del VDC basada en las secuencias del gen de la Hemaglutinina -----	<b>21</b>
Figura 4. Electroforesis de los productos amplificados del RT-PCR y PCR anidado para el VDC -----	<b>39</b>
Figura 5. Electroforesis de los productos amplificados del PCR para el gen de la Hemaglutinina -----	<b>40</b>
Figura 6. Electroforesis de los productos amplificados del PCR Anidado para el gen de la Hemaglutinina-----	<b>40</b>
Figura 7. Alineamiento de las secuencias de 611 nucleótidos que pertenecen al gen de la Hemaglutinina -----	<b>48</b>
Figura 8. Alineamiento de las secuencias de 203 aminoácidos que pertenecen al gen de la Hemaglutinina -----	<b>50</b>
Figura 9. Análisis filogenético entre 74 cepas del virus Distemper canino (VDC) basado en la secuencia de un fragmento del gen de la Hemaglutinina -----	<b>51</b>

## NOMENCLATURA

ADN/DNA	Ácido Desoxirribonucleico
ARN/RNA	Ácido Ribonucleico
ARN(-)	Ácido ribonucleico genómico de Polaridad negativa
°C	Grados Celsius
VDC	Virus Distemper canino
ml	Mililitros
mM	micromolar
nm	Nanómetros
pb	Pares de bases
pmol	Picomoles
PCR	Reacción en Cadena de Polimerasa
RT-PCR	Transcriptasa Reversa
rpm	Revoluciones por minuto
SNC	Sistema Nervioso Central
Taq	<i>Termus aquaticus</i>
μ	Microlitro
μM	Micromolar
UANL	Universidad Autónoma de Nuevo León
H	Hemaglutinina
EUA	Estados Unidos de América

## RESUMEN

El virus del Distemper canino (VDC) es un *Morbillivirus* considerablemente contagioso entre una extensa gama de animales mamíferos; a los cuales les provoca una enfermedad de amplio espectro clínico que van desde infecciones asintomáticas hasta letales. El VDC tiene un genoma ARN (-) monocatenario compuesto por aproximadamente 15,690 nucleótidos, el cual contiene genes que codifican para seis proteínas incluida la Hemaglutinina (H). La proteína H es una glucoproteína localizada en la membrana viral y es determinante en la unión virus-célula, en el tropismo celular y la patogenicidad. La secuencia completa o parcial del gen H ha sido usada extensivamente para evaluar la variación genética del VDC a nivel mundial. En este estudio, basado en el análisis de una fracción del gen de la H, se evaluó la relación filogenética de ocho secuencias del VDC obtenidas a partir de muestras clínicas de cinco caninos del área metropolitana de Monterrey N.L y un mapache de una zona rural cercana a Montemorelos, N.L. todos con manifestaciones clínicas compatibles con Distemper canino. En primera instancia, la infección por VDC se diagnosticó molecularmente a través de la detección del gen de la Nucleocápside (N) mediante RT-PCR y PCR anidado a partir de muestras clínicas. Posteriormente, se realizó la detección y amplificación del gen H con la ayuda de oligonucleótidos reportados previamente y subsecuentemente, con oligonucleótidos diseñado en el presente trabajo, se amplificó un fragmento de 611 nt dentro del gen H mediante PCR anidado. Un total de ocho secuencias genéticas de este fragmento fueron obtenidas y utilizadas para determinar las características genéticas y filogenéticas del VDC al compararlas con las secuencias de referencia, incluidas cepas vacúnales, depositadas en el GenBank®. Se encontró que las ocho secuencias obtenidas en este trabajo se ubicaron en un linaje, denominado arbitrariamente “Norte América”, en el cuál se situaron secuencias de aislados obtenidos exclusivamente en EUA. El análisis reveló divergencia nucleotídica de 7.9% y aminoácídica 7.5% respecto al linaje vacunal o América en donde están incluidas las vacunas que comúnmente son utilizadas para la inmunización contra VDC.

Palabras clave: Virus del Distemper canino (VDC); Filogenia; Vacuna; Hemaglutinina.

## 1. INTRODUCCIÓN

El Distemper Canino es una enfermedad altamente contagiosa y letal que afecta a una gran variedad de carnívoros, tiene afinidad por los sistemas respiratorio, digestivo y nervioso (Espinal, Diaz, & Ruiz-Saenz, 2014; Singethan et al., 2006; J. J. Zhao et al., 2010). El Virus del Distemper Canino (VDC) pertenece al orden *Mononegavirales*, a la familia *Paramyxoviridae* y al género *Morbillivirus*, posee un tamaño entre 150 y 300 nm, es un virus envuelto con genoma ARN no segmentado de una sola hebra y polaridad negativa, está formado por aproximadamente 15,690 nucleótidos (von Messling, Zimmer, Herrler, Haas, & Cattaneo, 2001; J. J. Zhao et al., 2010). El genoma viral incluye seis genes que codifican siguientes proteínas: grandes (L), nucleocápside (N), fosfoproteína (P), proteína de matriz (M), proteína de fusión (F) y la Hemaglutinina (H) (Guo et al., 2013; Negrao et al., 2013; Woma, van Vuuren, Bosman, Quan, & Oosthuizen, 2010).

El diagnóstico para el VDC se realiza utilizando muestras clínicas y sometiéndolas a distintos tipos de procedimientos de laboratorio entre los cuales están: el aislamiento del virus, técnicas inmunológicas (inmunofluorescencia y inmunocromatografía) y diagnósticos de tipo molecular, en este caso la técnica más utilizada es la reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR) (Fischer et al., 2013).

La vacunación es un factor importante para el control de la enfermedad, vacunas vivas atenuadas se desarrollaron con cepas clásicas (Onderstepoort, Snyder Hill y Rockborn), sin embargo, el VDC sigue causando brotes graves en todo el mundo, principalmente en algunas regiones en las que la aplicación de la vacuna es escasa (Fischer et al., 2013). La respuesta inmune a la vacunación va a depender de distintos factores entre los que están la virulencia de la cepa viral, condiciones ambientales, edad y el estado inmunológico del huésped (Fischer et al., 2013).

La proteína H es un factor determinante en la infección del virus Distemper canino, ya que esta proteína participa en unión a los receptores en la etapa inicial de la infección celular, en el desarrollo de una respuesta inmune sólida de protección contra el virus (Martella et al., 2006). En este sentido, la Hemaglutinina es una de las proteínas altamente involucradas en la determinación del tropismo, citopatogenicidad y variación antigénica. (Hashimoto, Une, & Mochizuki, 2001; Lan et al., 2006; Sawatsky & von Messling, 2010; Woma et al., 2010). En los *Morbillivirus* la Hemaglutinina es una de las proteínas más variables y se ha utilizado con frecuencia para evaluar la diversidad genética entre aislados de VDC (Negrao et al., 2013; J. Zhao et al., 2014). La variación de nucleótidos y aminoácidos en la Hemaglutinina podría interrumpir epítomos importantes en los sitios de unión relacionados con la neutralización viral (Negrao et al., 2013).

Los análisis genéticos de las cepas VDC en diversas zonas geográficas y de diversas especies animales han mostrado variaciones genéticas del gen H, lo cual se ha relacionado con la ubicación geográfica de las cepas circulantes (Woma et al., 2010). De acuerdo a últimos estudios los principales linajes de VDC identificados alrededor del mundo son: la cepa vacunal o América 1, América 2, Sur de América 2, Sur de América 3, Asia 1 y 2, Europa/Sur de América, Europa fauna o silvestre, Rock Born Like, Ártico y África (Espinal et al., 2014; Negrao et al., 2013). La enfermedad del moquillo canino se redujo significativamente en los países que iniciaron el uso de vacunas con virus vivos atenuados, estas vacunas han reducido los brotes del VDC desde la década de 1950 (Negrao et al., 2013). Sin embargo, esto no ha detenido por completo la propagación de la enfermedad, han sido reportados brotes de caninos vacunados y con signos asociados a la enfermedad (Fischer et al., 2013). La información a nivel molecular que existe actualmente de las cepas circulantes en la región del Noreste de México y en particular en la zona metropolitana de

Monterrey, N.L. es escasa. Por lo tanto el objetivo de este estudio es el de caracterizar genética y filogenéticamente, mediante el análisis de una fracción del gen de la Hemaglutinina, a las cepas del VDC que circulan en caninos con antecedentes o no de vacunación y signología clínica asociados al virus. Adicionalmente se tuvo la oportunidad de incluir las secuencias de nucleótidos obtenidas a partir de tres órganos de un mapache, el cual presentaba lesiones patológicas que sugerían infección por VDC, procedente de Montemorelos N. L. Todas las secuencias de nucleótidos obtenidas fueron comparadas con la secuencias genéticas de las cepas de referencia y con cepas empleadas en las vacunas disponibles comercialmente uso frecuente en caninos en el área metropolitana de Monterrey, N.L.

## **1.1 Objetivos**

### **1.1.1. Objetivo general**

Caracterizar genética y filogenéticamente, mediante el análisis de una fracción del gen de la Hemaglutinina, a las cepas del VDC que circulan en caninos con antecedentes o no de vacunación y signología clínica asociados al virus.

### **1.1.2. Objetivos específicos**

1. Realizar la detección molecular del Virus del Distemper Canino (VDC) a partir de muestras clínicas mediante RT-PCR y PCR anidado.
2. Detectar y amplificar un fragmento del gen de la Hemaglutinina (H) de cepas del VDC a partir de casos clínicos compatibles con Distemper Canino.
3. Obtener la secuencia de nucleótidos de un fragmento del gen H del VDC de cepas silvestres selectas que circulan en el área metropolitana de Monterrey, N.L.
4. Determinar la variación genética del fragmento de el gen H del VDC mediante la comparación de las secuencias de nucleótidos y aminoácidos con las cepas vacúnales y de referencia.
5. Determinar las relaciones filogenéticas entre las cepas del VDC del área metropolitana de Monterrey, N.L; la cepas de referencia y las cepas incluidas en las vacunas disponibles comercialmente.

## **1.2 Hipótesis**

El gen de la Hemaglutinina (H) de cepas del VDC que circulan en caninos afectados clínicamente en el área metropolitana de Monterrey Nuevo León es distinto al gen H de las cepas vacúnales usados comercialmente.

## **1.3 Justificación**

A pesar del uso rutinario de la vacunación contra el Distemper canino, como método de prevención, la frecuencia y aparición de esta enfermedad en caninos del área metropolitana de Monterrey, N.L. aparentemente ha sido cada vez más alta. En esta zona, la información a nivel molecular que existe actualmente del VDC es escasa o no existe. Por lo tanto, se desconocen las variaciones genéticas que existen en las cepas circulantes de la región y en particular del gen de la Hemaglutinina. Estas variaciones pueden afectar directamente en la respuesta del hospedero hacia la vacuna. Por esto es importante iniciar con los trabajos de investigación genética de virus Distemper canino para posteriormente hacer una comparación de las cepas vacúnales y las circulantes en el área de Monterrey Nuevo León, México. Este trabajo nos permitirá poder conocer genéticamente una porción del VDC y saber más del virus en la región, ya pensando en futuro un mayor control en la propagación viral.

## **2. REVISION DE LA LITERATURA**

### **2.1. Características virales**

El VDC forma parte de la Familia *Paramixoviridae*, pertenece al género *Morbillivirus* y al orden Mononegavirales (Espinal et al., 2014; von Messling et al., 2001), el género *Morbillivirus* comprende el virus Sarampión, el virus de la Peste de los rumiantes (Rinderpest), Morbillivirus de delfines y marsopas y el virus de Distemper de focas (Céspedes P., 2010; Timothy Y. Woma, 2010). Es un virus envuelto helicoidal de una sola hebra de polaridad negativa, mide de aproximadamente de 150-300 nm y contiene 15690 nucleótidos (Espinal Restrepo María Adelaida., 2013). El genoma viral codifica a seis proteínas: nucleocápside (N), fosfoproteína (P), proteína grande (L), proteína de la matriz (M), y dos glicoproteínas, la hemaglutina (H) y la proteína de fusión (F). (Espinal Restrepo María Adelaida., 2013; Hiram et al., 2004; Orvell, Blixenkrone-Moller, Svansson, & Have, 1990; Pinotti M et al., 2009; Yi et al., 2012).

### **2.2. Proteínas virales**

#### **2.2.1 Nucleocápside**

La proteína de la nucleocápside está presente en la primera transcripción de genoma viral del VDC, es codificada por el gen N y consta de 1683 nucleótidos y 525 aminoácidos. La proteína de la nucleocápside está formada por dos dominios estructurales: N-terminal y C-terminal. Entre los virus relacionados alrededor del 80% de la región del anillo terminal de la proteína se encuentra bastante conservado, mientras que el 20% de la región carboxilo terminal es pobremente conservado. En la replicación viral la proteína N tiene varias funciones, intervienen en la encapsidación del ARN genómico, se asocia con la polimerasa

durante la transcripción y la replicación, es muy probable que interactúe con la proteína M durante el ensamblaje del virus (Knipe DM et al., 2007). Es la proteína de unión al RNA que se autoensambla con el genoma viral de VDC y el RNA antisentido formando junto con las proteínas grandes y las fosfoproteínas el complejo el complejo Ribonucleoproteína (RNP) (Lamb et al., 2007; Nicolas Sarute, 2012).

### **2.2.2. Fosfoproteína**

La fosfoproteína está constituida por 507 aminoácidos y 1655 nucleótidos, es un cofactor de la polimerasa activado por fosforilación (Lamb et al., 2007; Nicolas Sarute, 2012). Esta denominación la recibe por el alto nivel de fosforilación que presenta, es una proteína muy variable en su longitud dentro de los virus de la familia y está compuesta por dos dominios, el N-terminal y el C-terminal, separados por una región hipervariable. La proteína P desempeña un papel importante en la síntesis de ARN, pues junto con la proteína L forman la polimerasa viral y junto con la proteína de la Nucleocápside forman el complejo Ribonucleoproteína (RNP) que se supone active la encapsidación del ARN (Knipe DM, 2007). Las proteínas C y V también son traducidas por el mismo ARN mensajero (ARN<sub>m</sub>) que transcribe al gen de la fosfoproteína, ambas proteínas presentan los primeros 231 aminoácidos, pero los siguientes 68 aminoácidos del extremo C-Terminal de la proteína V difieren de la Fosfoproteína (Nicolas Sarute, 2012).

### **2.2.3. Proteína de matriz**

La proteína de la matriz es codificada por el gen M y consta de 335 aminoácidos y 1442 nucleótidos. Es una proteína básica y algo hidrofóbica, la asociación que existe entre proteínas y su contacto con la nucleocápside ayuda en la formación de la partícula viral

(Knipe DM, 2007). Por otra parte participa en el ensamblaje del virión, así como en la organización y morfología viral. La proteína de M tiene interacción directa con las glicoproteínas de membrana; Hemaglutinina y proteína de Fusión, la bicapa lipídica y el complejo Ribonucleoproteína (RNP) (Lamb et al., 2007; Nicolas Sarute, 2012).

#### **2.2.4. Proteína de fusión**

La proteína de fusión es una glicoproteína constituida por 662 aminoácidos y 2205 nucleótidos (Nicolas Sarute, 2012). Esta proteína es un factor crítico en la infección y la patogenia de la familia *Paramixoviridae*. Induce la fusión de la envoltura viral con la membrana plasmática de la célula huésped, también se encarga de la fusión entre células del hospedero, lo que permite la propagación del virus, induciendo la formación de grandes sincitios (Knipe DM et al., 2007). Se caracteriza como una proteína integral de membrana tipo dos y es resultado de la codificación del gen F con un precursor inactivo pre-F0, para inicial con el proceso es necesario el reconocimiento del péptido señal (Fsp) y su transporte al retículo endoplásmico (RE), donde el precursor pre-F0 pasa por un proceso de co-traducción (Nicolas Sarute, 2012; von Messling & Cattaneo, 2002). Este proceso es realizado entre los aminoácidos 135-136, generando un Fsp y un precursor inmaduro (P0) por acción de un péptidasa celular (Spase). En este proceso se forman dos subunidades F1 y F2 por la glucosilación y el clivado de una furina celular, estas dos subunidades se mantienen unidas en la forma de un heteródimero el cual presenta la forma activa de la proteína. El Fsp no forma parte de la proteína madura pero se ha demostrado que afecta indirectamente en la fusión de la proteína y la patogénesis viral. La proteína de fusión forma un trímero, que de la mano con la Hemaglutinina interactúa en el proceso de fusión

del VDC a la célula del hospedero (Nicolas Sarute, 2012; von Messling, Milosevic, Devaux, & Cattaneo, 2004).

### **2.2.5. Hemaglutinina**

La Hemaglutinina es una proteína codificada por el gen H consta de 607 aminoácidos y 1947 nucleótidos, es una proteína tipo II que actúa como mediadora en la unión a la célula diana por interacción con el receptor celular y la señalización de la activación linfocítica molecular (SLAM) que también se conoce como CD150 y también puede desempeñar un papel en la inducción de inmunidad protectora (Han, Liu, & Li, 2008). Es la responsable de la absorción del virus al ácido siálico contenido en la membrana celular. Tiene actividad hemaglutinante y contiene un dominio hidrofóbico localizado en el N-terminal que actúa como señal de anclaje a la membrana (Knipe DM et al., 2007). La Hemaglutinina es la proteína más variable de los *Morbillivirus*, por este motivo es determinante del tropismo y citopatogenicidad viral de VDC (von Messling et al., 2001).

### **2.2.6. Proteínas grandes**

La proteína está constituida por 2184 aminoácidos y 6573 nucleótidos, de todas las proteínas estructurales es la menos abundante lo que se debe a su tamaño, longitud y localización activa en la transcripción viral; se sugiere que podría ser la polimerasa viral. El complejo formado por la proteína L y la proteína P es requerido para la actividad polimerasa con la proteína de la Nucleocápside y la cadena molde de ARN, es la subunidad fundamental del complejo del ARN debido a su rol catalítico en la síntesis del ARN viral. La proteína L interactúa con la fosfoproteína para formar el complejo de la polimerasa

activo y es constituyente integral de la nucleocápside del virón (Knipe DM et al., 2007; Nicolas Sarute, 2012).

### **2.3. Replicación viral**

La replicación es realizada en el citoplasma a las 14-24 horas iniciada la infección, la glicoproteína H, actúa como intermediaria en la unión del virus con la membrana celular, mientras que la proteína de fusión actúa en la unión de las dos membranas lo que facilita la entrada del RNA viral en el citoplasma. El RNA viral necesita un intermediario autorreplicativo para generar su RNA mensajero por este motivo las proteínas N, P y L constituyen el complejo de la ribonucleoproteína (RNP) y este complejo actúa como molde para la transcripción y replicación del genoma viral (Pinotti M et al., 2009; von Messling et al., 2001). Una vez que la nucleocápside es liberada en el citoplasma la polimerasa RNA dependiente comienza la transcripción desde el extremo 3' hasta el final de genoma realizándose así una cadena de polaridad positiva, partiendo de esta cadena se generan los ARNm de cada gen (Pinotti M et al., 2009). Para ensamblaje y maduración de los viriones es necesario la incorporación de glicoproteínas virales en la membrana plasmática de la célula hospedadora, la asociación de la proteína de matriz y de otra proteína no glicosilada con la membrana celular modificada. Por último el alineamiento de la nucleocápside con la proteína de matriz, la liberación de los viriones maduros es realizada por gemación, estos viriones están cubiertos por una envoltura compuesta por lípidos de origen celular y glicoproteínas virales (Pinotti M et al., 2009).

## 2.4. Patogénesis

Las principales vías de ingreso del VDC son la aerógena, ocular-respiratoria y oral, el virus necesita directamente el contacto con las mucosas en donde establece la primera interacción con el sistema inmune del huésped, afectando directamente a los linfocitos y células mononucleadas CD150 (Céspedes P et al., 2010). En el inicio de la infección el VDC realiza una serie de mecanismos que permiten neutralizar y evadir la inmunidad pasiva y la adaptativa: a) Uso de las células inmunes como transporte a los nódulos linfáticos regionales b) replicación deletérea en subpoblaciones de linfocitos entre el 1-3 día postinfección, c) establecimiento de la primer etapa de la viremia asociada a leucocitos, d) replicación masiva en órganos linfoides con agotamiento selectivo de la subpoblación Th1, e) formación del cuadro multi-sistémico al día 7 (Céspedes P et al., 2010). El receptor CD150 está expresado ampliamente en las diferentes poblaciones celulares del hospedero, forma parte constitutiva en las células hematopoyéticas y es inducible en los linfocitos T efectores y células plasmáticas. Esta distribución del receptor en las poblaciones de los linfocitos explica el linfotropismo del VDC y la importancia de la proteína Hemaglutinina en la virulencia y citopatogenicidad de VDC respecto a los otros *Morbillivirus*, siendo un determinante para la infección y el tropismo viral, la unión de estas dos moléculas (Céspedes P et al., 2010). Posterior a la primera etapa de infección se realiza un síntesis de ARN mensajero y su replicación forma el complejo Ribonucleoproteico (RNP), evitando así el reconocimiento de intermediarios de ARN doble hebra por parte de TLR-3 (*Toll Like Receptor-3*) y se inhibe la activación del factor de transcripción NF-κB (*Nuclear Factor-Kappa B*) siendo este el responsable de activar la expresión de citoquinas proinflamatorias, quimioquinas, moléculas de adhesión y receptores inmunológicos. A continuación el ciclo

de replicación es directamente mediado por los derivados del gen de la Fosfoproteína : las proteínas V y C. la proteína V inhibe las vías de señalización de JAK (*Janus Kinase*)/STAT (*Signal Transducer and Activator of Transcription*) marcando el STAT1,2 o 4 para su degradación proteosomal, interfiriendo en la activación dependiente de la fosforilación, que esta mediada por el complejo JAK-receptor de citoquina causando niveles bajos en la transcripción y expresión de proteínas antivirales, citoquinas proinflamatorias, (TNF- $\alpha$  e IL-6), citoquinas Th1 y Th2 específicas (IL-2 e IL-4) e interferones de la clase 1 (INF $\alpha$  y  $\beta$ ) esto determinara la virulencia en la infección del huésped. Por otra parte la proteína C es encargada del ensamblaje y la liberación de partículas virales estables, afirmando las fases tardías en la infección multisistémica. La nucleocápside viral participa como un factor soluble al receptor CD32 (Fc $\gamma$ RII) de linfocitos B, iniciando eventos que ayudan a disminuir su actividad proliferativa (Céspedes P et al., 2010).

La diseminación viral ocurre vía sanguínea y linfática a tejidos hematopoyéticos, posteriormente termina en una infección generalizada de todos los tejidos linfoides incluyendo bazo, timo, nódulos linfáticos, medula ósea, tejidos linfoides asociados a mucosa (MALT) y macrófagos del tracto gastrointestinal y en las células de Kupffer (Pinotti M et al., 2009). En estos tejidos el virus produce un efecto deletéreo sobre la respuesta inmune adaptativa antiviral, donde los linfocitos CD4<sup>+</sup> Th1 son disminuidos por apoptosis, afectando directamente la actividad de células B y T CD8<sup>+</sup> involucrados en la respuesta Th1 dentro las primeras 72 horas post-infección. Entre el día 1-7 post-infección se desarrolla una severa leucopenia seguido de la baja del 80% de las células mononucleares periféricas y un alto porcentaje de linfocitos T y B que fueron infectados (40-60%) (Céspedes P et al., 2010). Posteriormente la segunda parte de la viremia ocurre en los

siguientes días, donde la infección se propaga en células de tejidos parenquimatosos de todo el organismo. El virus del Distemper canino puede ser encontrado en células del sistema respiratorio, gastrointestinal, urinario, endócrino, linfático y en el SNC, así como en vasos sanguíneos, queratinocitos, fibroblastos, trombocitos entre otras células (Pinotti M et al., 2009). Esta etapa es caracterizada por altos títulos virales y el inicio del cuadro clínico (Céspedes P et al., 2010).

El VDC atraviesa la barrera hematoencefálica, debido a la severa inmunodepresión y posteriormente se desarrolla un proceso temprano de desmielinización no inflamatoria que se desarrolla por la replicación viral en astrocitos y microglia, encargados de la propagación viral. En este proceso se limita la síntesis de mielina, por la sobreexpresión de la proteína básica de mielina (PBM) y la enzima cerebrósido-sulfotransferasa. Existe un sobreexpresión del complejo mayor de histocompatibilidad de tipo II (CMH II), de moléculas de adhesión (CD44), las cuales son las responsables del daño sobre la vaina de mielina (Céspedes P et al., 2010). Adicionalmente ocurre un aumento de expresión de citoquinas proinflamatorias (IL-1, IL-6) y el Factor de Necrosis Tumoral (TNF). El efecto de la infección sobre las subpoblaciones Th1 CD4<sup>+</sup> es de corto plazo, sin embargo en las subpoblaciones Th2 y CD8<sup>+</sup>, CD25<sup>+</sup> citotóxica, estas subpoblaciones se recuperan en brevedad lo que permite eliminar la infección del sistema en un lapso de 14-21 días (Céspedes P et al., 2010).

## **2.5. Manifestaciones clínicas**

El virus Distemper canino tiene afinidad por los sistemas respiratorio, digestivo y nervioso, afectando en algunas ocasiones al sistema tegumentario. Existe mucha variación en la severidad de la infección y la presentación clínica así como la duración, esto va depender

del estado inmunitario, la edad del animal y la virulencia de la cepa. El 70 % de los casos de el VDC es subclínico siendo la fiebre, tos, depresión, conjuntivitis o lagrimeo los principales signos, por esto existe una recuperación y pasa desapercibida la enfermedad (Nicolas Sarute, 2012). Partiendo del inicio de la infección, a partir del día 10 inician las manifestaciones clínicas en el sistema respiratorio generalmente son: rinitis serosa o mucopurulenta, neumonía intersticial y bronquiolitis necrotizante, y en algunas ocasiones bronconeumonía supurativa debido a bacterias oportunistas (Pinotti Mario et al., 2011). En el caso del sistema digestivo, se caracteriza por gastroenteritis y diarrea (en ocasiones hemorrágica) (Lan et al., 2005; Negro et al., 2013; Nicolas Sarute, 2012). En el sistema tegumentario, aparece la dermatitis pustular también conocido como exantema del Distemper esta lesión se ubica en la parte ventral abdominal, en el pabellón auricular y la parte interna de los muslos, otro signo sería hiperqueratosis nasal y plantar así como hipoplasia del esmalte (Figura.1) (Pinotti Mario et al., 2011). Los signos nerviosos son: mioclonías, nistagmo, ataxia, tetraparesis, parálisis entre otros (Pinotti M et al., 2009).



**Figura 1. Signos clínicos característicos de la infección causada por el virus Distemper canino** I. Descarga nasal. II. Hipoplasia del esmalte. III. Hiperqueratosis nasal. IV. Hiperqueratosis plantar. Imágenes obtenidas de los sitios web: <http://www.veterinarioperu.com/>, <http://www.petrescuegt.org/>.

## 2.6. Hospedadores

El virus Distemper canino causa una de las enfermedades virales más importantes que afecta a caninos y que recientemente se ha expandido a otros carnívoros (Calderon et al., 2007; Meli et al., 2010; Mochizuki, Hashimoto, Hagiwara, Yoshida, & Ishiguro, 1999; Yi et al., 2013; J. Zhao et al., 2014). Los principales hospederos del VDC incluyen una gran

cantidad de familias del orden carnívora: *Canidae* (Perro doméstico, coyote, lobo chacal, zorro, dingo, licaon africano) *Procyonidae* (coati, mapaches) *Mustelidae* (hurones, visones y martha), *Mephitidae* (zorrillos), *Hyaenidae* (hienas), *Ursidae* (osos), *Ailuridae* (pandas rojos), *Viverridae* (ginetas y civetas), *Felidae* (tigres, leones, leopardos y jaguares), también VDC se puede encontrar en mamíferos marinos miembros de la familia *Phocidae* (nerpa o foca de agua dulce). El VDC ha presentado también en pecaríes del collar (*Tayassu tajacu*) y en primates (*Macaca fuscata*), monos Rhesus (*Macaca mulatta*) (Guo et al., 2013; Martella, Elia, & Buonavoglia, 2008; Pinotti M., 2009; Nicolas Sarute, 2012).Tabla 1.

**Tabla 1. Descripción las familias y especies afectadas por el VDC.**

<b>Familia</b>	<b>Nombre común</b>
<i>Canidae</i>	Perro doméstico, coyote, lobo chacal, zorro, dingo, licaon africano
<i>Procyonidae</i>	Coati, mapache
<i>Mustelidae</i>	Hurón , visón, marta
<i>Felidae</i>	León, guepardo, pantera, jaguar y tigre
<i>Phocidae</i>	Nerpa
<i>Mephitidae</i>	Zorrillo
<i>Ursidae</i>	Oso
<i>Hyaenidae</i>	Hiena
<i>Ursidae</i>	Oso panda
<i>Viverridae</i>	Ginetas y civetas

## **2.7. Lesiones**

La infección sistémica del VDC ocasiona lesiones en los tejidos linfoides, los nódulos linfáticos se ven aumentados, y provoca depleción del MALT y atrofia del timo. Las lesiones en el tracto respiratorio son la inflamación del árbol traqueobronquial y rinitis, y en los pulmones se encuentran neumonía intersticial difusa y bronqueneumonía. En la cavidad oral se caracteriza por hipoplasia del esmalte, y en el sistema urinario presenta edema en la vejiga. En el SNC encontramos desmielinización en el cerebelo y menos frecuente en materia blanca del cerebro y en la medula espinal. La hiperqueratosis palmar y plantar es una manifestación cutánea que no se encuentra frecuentemente en la infección del VDC (Pinotti M et al., 2009).

## **2.8. Diagnostico**

El VDC se reconoce principalmente por los signos producidos en la infección multisistémica y en hematología los hallazgos son leucocitosis y linfopenia. Los métodos específicos incluyen inmunofluorescencia directa (IFD), esta se realiza a partir de muestras clínicas (hisopados nasales, conjuntivales y genitales, sangre u orina. La serología también es utilizada para el diagnóstico de VDC (ELISA), que son altamente sensibles y detectan anticuerpos séricos IgM e IgG (Martella et al., 2008). Existen diagnósticos moleculares en los cuales se encuentran el RT-PCR, el cual amplifica fragmentos de ácidos nucleicos a grandes cantidades, desde el segundo día de la infección. Por este método con una sola molécula es posible diagnosticar el VDC. Los genes más utilizados para el diagnóstico de VDC son el gen N y el gen F (Espinal et al., 2014; Pinotti M et al., 2009).

## **2.9. Tratamiento**

La terapia contra VDC es sintomática, basada en el uso de antibióticos de amplio espectro, que ayudan a controlar las infecciones por bacterias oportunistas frecuentemente encontradas en Distemper canino a causa la severa inmunodepresión. Cuando se presentan los signos nerviosos son irreversibles, en la mayoría de los casos progresivos, y en pueden llegar a la muerte del hospedero o quedar con secuelas permanentes (Pinotti M et al., 2009). Recientemente se ha probado tratamientos alternativos como el uso de interferones en las primaras etapas de la infección; así como antivirales tales como Ribavirina medicamento probado in vitro sobre mono-capas de células VERO infectadas por VDC, esto obtuvo prometedores resultados dando una herramienta en el control de Distemper canino (Elia et al., 2008; Martella et al., 2008).

## **2.10. Prevención y control**

La vacunación de cachorros y adultos caninos como prevención de VDC es la estrategia más utilizada alrededor del mundo. La enfermedad del Distemper canino se redujo significativamente en los países que iniciaron el uso de vacunas a partir de 1950, para la elaboración de estas vacunas fueron utilizados virus vivos atenuados (Li et al., 2014; Negro et al., 2013; Uema, Ohashi, Wakasa, & Kai, 2005). Las vacunas son elaboradas con cepas clásicas: “Onderstepoort”, “Snyder Hill” y “Rockborn”(Martella et al., 2008).

Sin embargo, esto no ha detenido por completo la propagación de la infección observándose brotes en poblaciones inmunizadas, las principales causas son: la reversión de las cepas atenuadas a la virulencia, la aparición de nuevas cepas con variaciones que evaden la respuesta inmune a la vacuna, el estado fisiológico del hospedero así como la

falla en la administración de vacunas (Nicolas Sarute, 2012). En últimos estudios se ha demostrado importante variabilidad entre cepas circulantes y vacúnales (An, Yoon, Park, No, & Park, 2008; Bolt et al., 1997; Calderon et al., 2007; Haas et al., 1997; Hashimoto et al., 2001; Martella et al., 2006; Mochizuki et al., 1999; Negro et al., 2013; N. Sarute et al., 2014; Simon-Martinez, Ulloa-Arvizu, Soriano, & Fajardo, 2008)

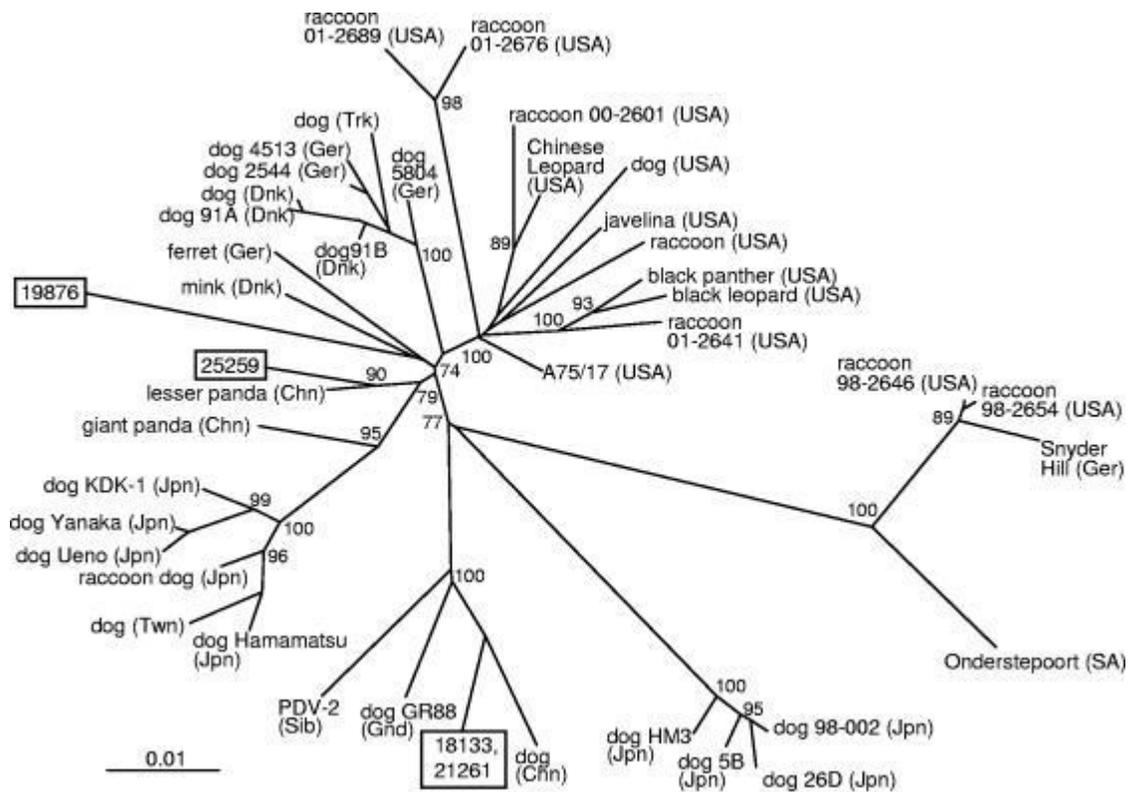
### **2.11. Variabilidad genética**

Se han realizado diversos estudios filogenéticos, en diversas zonas geográficas a partir de la secuenciación de genes que se consideran informativos. En México se analizaron filogenéticamente secuencias del gen de la Nucleocápside, donde fue reportado que las secuencias mexicanas se distribuían en un linaje nuevo (Gamiz et al., 2011; Simon-Martinez et al., 2008).

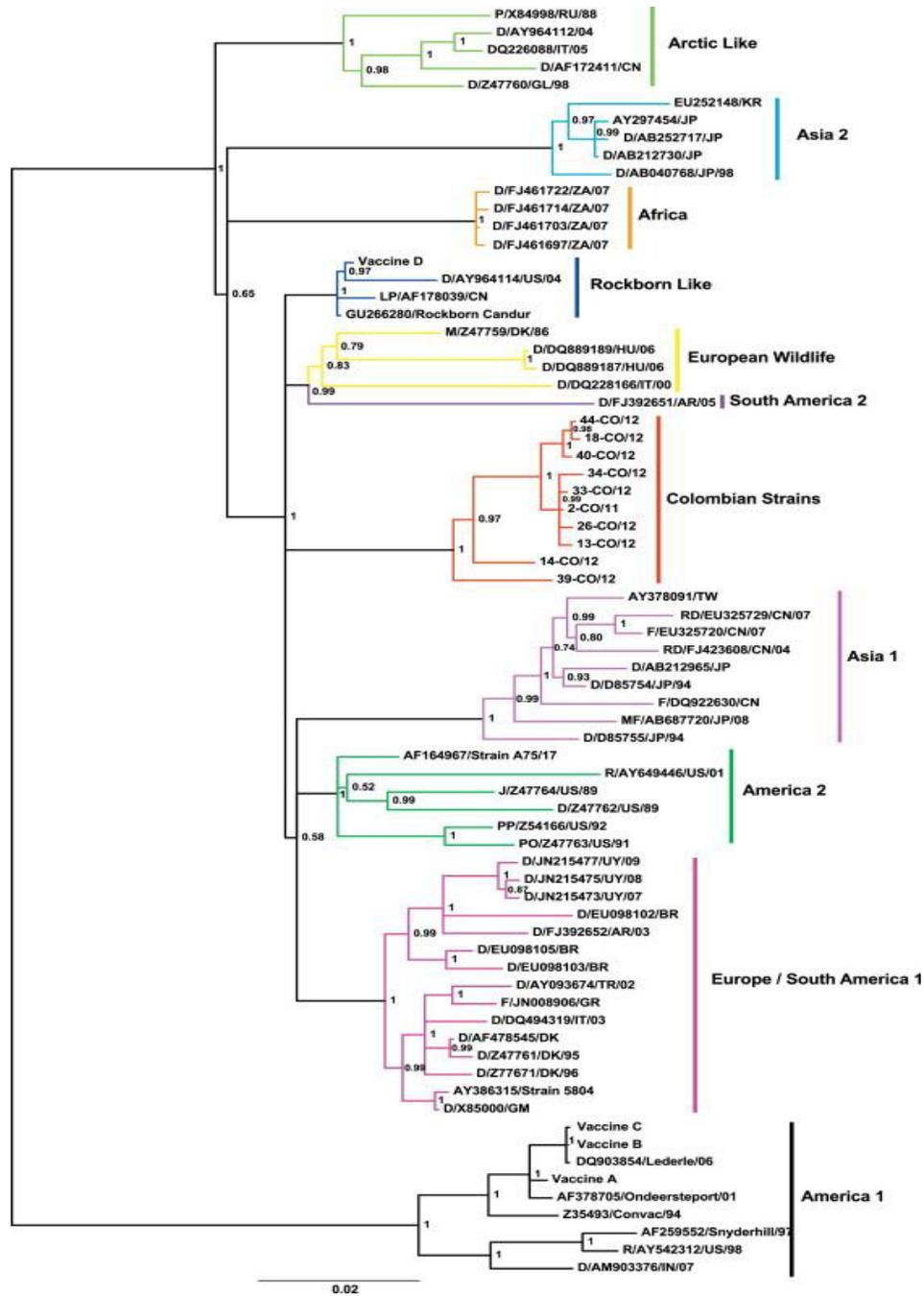
Otro gen que se ha utilizado para hacer análisis filogenéticos es el gen F que codifica la proteína de fusión, es la encargada de inducir la fusión de la envoltura viral con la membrana plasmática de la célula huésped. (Ozkul, Sancak, Gungor, & Burgu, 2004; Panzera et al., 2012; Visser et al., 1993).

En los noventa fueron encontradas evidencias de VDC en grandes felinos (Harder et al., 1995), las secuencias fueron analizadas filogenéticamente utilizando un gen altamente variable, el gen de la Hemaglutinina (Harder et al., 1996; Iwatsuki et al., 1997). El análisis genético de las cepas VDC en diferentes zonas del mundo y a una gran cantidad de especies de animales ha demostrado que las variaciones en el gen H están relacionadas a la ubicación geográfica de las cepas circulantes (Woma et al., 2010). De acuerdo a últimos estudios los principales linajes de VDC identificados alrededor del mundo son: la cepa

vacunal o América 1, América 2, Sur de América 2, Sur de América 3, Asia 1 y 2, Europa/Sur de América, Europa fauna, Ártico, Sur de África y Rockborn. (Espinal et al., 2014; Woma et al., 2010; Yi et al., 2013). Algunos de los linajes reportados se encuentran en las Figuras 2 y 3.



**Figura 2.** Árbol filogenético de las secuencias completas del gen H de VDC. El árbol sin raíz se generó usando el método de distancia “Neighbor-joining” con el modelo evolutivo “Kimura two parameter” (Pardo, Johnson, & Kleiboeker, 2005).



**Figura 3.** Árbol filogenético entre 72 cepas del VDC basada en las secuencias del gen de la Hemaglutinina. El árbol filogenético fue inferido por el método de análisis Bayesiano. Se muestran 11 linajes de diferentes zonas geográficas y de diferentes especies. (Espinal et al., 2014).

## **2.12. N-glicosilación**

La N-glicosilación se caracteriza por la adición de un oligosacárido complejo al grupo amino libre en una proteína. Las secuencias donde existe la adición del oligosacárido son los sitios donde se encontraba la secuencia N, X, S/T donde N pertenece a Arginina, X a cualquier aminoácido a excepción de Prolina, S pertenece a Serina y T a Triptófano. Por otra parte, la estructura tridimensional de la proteína H de este *Morbillivirus* sugiere que un extenso enmascaramiento de los epítomos antigénicos por restos de azúcar puede obstaculizar la unión de anticuerpos neutralizantes frente a la proteína H (J. Zhao et al., 2014). Los cambios en la N-glicosilación se han asociado con el aumento de la virulencia en cepas VDC ya que los virus recombinantes que expresan proteínas H con sitios deficientes de N-glicosilación ya no causan la enfermedad, a pesar de sus capacidades inmunosupresoras sean retenidas.

## **2.13. Selección natural**

La selección natural a nivel molecular se puede clasificar en dos tipos: Selección positiva o también llamada balanceadora que promueve a las nuevas mutaciones poseen adecuaciones mayores que el promedio de la población incrementen su frecuencia en las siguientes generaciones, incrementando así la diversidad genética. La selección negativa también llamada purificadora es la que elimina las mutaciones que poseen adecuaciones menores que el promedio en la población, de esta manera se reduce la diversidad con la eliminación de las variantes en la población. Esta adaptación a nivel molecular se puede estudiar por dos conceptos: la distribución del polimorfismo en las secuencias de ADN y la determinación de las sustituciones sinónimas y no-sinónimas en las secuencias codificantes de ADN utilizando el codón como unidad evolutiva. Cuando una mutación no-sinónima en

un codón en particular de la secuencia de ADN tiene un efecto en la función o la expresión de la proteína entonces la tasa de sustituciones no-sinónima, debería ser comparable a la tasa de sustituciones sinónimas ( $dS$ ), por esto se dice que evoluciona de manera neutral. El exceso de sustituciones no-sinónimas ( $dN > dS$ ) puede ser interpretado como la selección positiva y sugiere entonces que el remplazamiento aumenta la eficacia biológica. (Eguiarte et al., 2007).

### **3. MATERIAL Y MÉTODOS**

#### **3.1. Material**

##### **3.1.1. Equipos**

- Campana de flujo laminar clase II ThermoScientific 1300 SERIES A2.
- Cabina para PCR, UVP UV<sup>99</sup> SterilizingPCRcabinet.
- Centrifuga refrigerada, y el rotor para tubos de 1.5 ml y de 2 ml Labnet HERMLE.
- Bascula digital, Denver Instrument APX-200.
- Homogenizador, DaiggerVortexxGenie 2 Cat N° 3030<sup>a</sup>.
- Termociclador, AxigenMaxygene.
- Refrigerador 2 -4°C.
- Ultra congelador de -20°C
- Congelador de -70°C
- Bloque térmico
- Cámara de electroforesis Labnet International, Inc Enduro ElectrophoresisSystem.
- Micropipetas (1000/100µl); (200/20µl); (100/10µl); (10/0.5µl).

##### **3.1.2 Material biológico**

Vacuna Novibac Puppy DP (Vacuna de virus vivo combinado, cada dosis contiene al menos de  $10^{5.0}$  DICT<sub>50</sub> del virus del Distemper canino cepa Ondersterpoort y al menos  $10^{7.0}$  DICT<sub>50</sub> de parvovirus canino cepa C154.

### **3.1.3. Reactivos y estuches comerciales**

- AxyPrep Body Fluid Viral RNA Miniprep Kit” (Axygen Biosciences):
- SuperScript® III One-Step RT-PCR System with PlatinumTaq Dna Polymerase (Invitrogen®).
- Kit Platinum® PCR SuperMix (Invitrogen®).
- RevertAid™ Premium First Strand cDNA Synthesis (Thermo Scientific)
- Phusion Hot Start II High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Scientific)
- Marcador de peso molecular para ADN (100 bp DNA Ladder)

### **3.1.4. Reactivos y consumibles para la extracción de ARN a partir de muestras clínicas.**

- AxyPrep Body Fluid Viral RNA Miniprep Kit” (Axygen Biosciences).
- Tubos de polipropileno de microcentrifuga.
- Puntillas desechables para micropipeta con filtro de 10 y 200 µl.
- Puntillas desechables sin filtro de 100 y 1000 µl.

### **3.1.5. Reactivos y consumibles de RT-PCR, PCR y electroforesis.**

- Agua ddDEPC: H<sub>2</sub>O estéril libre de nucleasas incluido en el kit de RT-PCR onestep Kit AccessQuick™ de PROMEGA®
- Agua ddPCR: H<sub>2</sub>O doblemente bidestilada y esterilizada en autoclave.
- SuperScript® III One-Step RT-PCR SystemwithPlatinumTaq Dna Polymerase (Invitrogen®).

- Kit Platinum® PCR SuperMix (Invitrogen®).
- RevertAid™ Premium First Strand cDNA Synthesis (Thermo Scientific)
- Kit Maxima Hot start Taq DNA Polymerase (Thermo Scientific)
- Solución de agarosa al 1 y 1.5 % (w/v) en buffer SB.
- Buffer para electroforesis ARN/ADN: SB 1X (0.30915% Ácido bórico, 0.03% NaOH)
- Marcador de peso molecular para ADN: 100 bp DNA Ladder
- 6x Loading buffer with Gel Red 300 µl, (GenScript)

## **3.2. Metodología de la investigación**

### **3.2.1. Lugar de trabajo**

Las muestras fueron analizadas en el Departamento de Virología y en el Departamento de Genética de la Facultad de Veterinaria Y Zootecnia de la UANL.

### **3.2.2 Obtención y tipos de muestras**

Las muestras clínicas utilizadas para la detección de VDC este estudio fueron: hisopado conjuntival y nasal de un canino con sintomatología asociada a VDC y calendario completo de vacunación, así mismo se utilizaron muestras clínicas de tejido de pulmón, de 4 caninos con un calendario parcial de vacunación, y muestras clínicas de tejido de pulmón, hígado e intestino de un mapache procedente de Montemorelos N. L. Estas muestras fueron remitidas al Departamento de Virología de la FMVZ de la UANL y precedían de distintas áreas de la zona metropolitana de Monterrey, Nuevo León México en el periodo de Agosto 2013 a Agosto 2014 siendo la del mapache la única recibida en el año 2010.

### **3.2.3 Extracción de ácidos nucleicos (ARN)**

La extracción de ARN total se llevó a cabo utilizando el estuche comercial "AxyPrep Body Fluid Viral RNA Miniprep Kit" (Axygen Biosciences), siguiendo las recomendaciones del fabricante. El ARN total obtenido se conservó a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

#### **3.2.3.1 Extracción de ARN a partir de órganos, hisopado nasal e hisopado conjuntival.**

Las muestras fueron tomadas por los médicos veterinarios y conservadas en solución salina fisiológica, estando cubierto el hisopo por dicha solución, estos hisopos se conservaron en refrigeración ( $4^{\circ}\text{C}$ ) y fueron remitidas al Departamento de Virología, una vez en el laboratorio se agitaron los hisopos con la ayuda de un agitador eléctrico tipo "vortex" para homogenizar el material biológico encontrado en la solución salina fisiológica. Se extrajo el hisopo y se conservó a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su uso. En el caso de los órganos estos fueron conservados en congelación de  $-20^{\circ}\text{C}$  antes de su uso en los análisis posteriores.

Se procedió con la extracción de ácidos nucleicos a partir de la solución salina fisiológica se colocaron 200  $\mu\text{l}$  de muestra, 100  $\mu\text{l}$  de la muestra de hisopado nasal y 100  $\mu\text{l}$  de hisopado conjuntival en un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml. se añadieron 400  $\mu\text{l}$ . del buffer R-I se procedió a homogenizar con ayuda del vortex y se incubaron a temperatura ambiente durante 5 minutos. En el caso de los órganos, se pesaron de 20 a 40 mg del tejido y se maceraron en mortero con nitrógeno líquido. Posteriormente se agregaron 150  $\mu\text{l}$ . del buffer RII, y se mezclaron en el vortex siguiendo con las instrucciones de centrifugaron a 12,000 rpm por 5 minutos. El sobrenadante se transfirió a un tubo de 2 ml y se añadieron 250  $\mu\text{l}$ . de alcohol (isopropanol + 1% de Ácido Acético) se y se procedió a mezclar en el

vortex. A continuación se transfirió el contenido del tubo en una columna y centrifugo a 6000 rpm por un minuto. Se desechó el filtrado y se colocó la columna sobre un tubo estéril de ml, se agregaron 500 µl del buffer W1A en la columna incubándola a temperatura ambiente durante un minuto, para después centrifugar a 12,000 rpm por un minuto. Se procedió a desechar el filtrado y se colocó la columna en el tubo, se agregaron 800 µl del buffer W2 a continuación se centrifugo a 12,000 rpm por un minuto. Se desechó el filtrado y se repitió nuevamente el centrifugado a 12,000 rpm para remover los residuos del buffer de lavado.

La columna se transfirió a un tubo estéril de 1.5 ml y se agregaron 50 µl de buffer TE (buffer de dilución libre de nucleasas) y posteriormente se incubo durante un minuto a temperatura ambiente. Por último, se centrifugo por un minuto a 12 000 rpm, se desechó la columna, y el contenido del tubo se conservó a -70°C hasta su uso.

### **3.2.4 Reacción en cadena de polimerasa (PCR)**

Selección y elaboración de oligonucleótidos que fueron utilizados en esta investigación se muestran en la tabla 2. Los oligonucleótidos fueron seleccionados de distintos reportes científicos y dos diseñados en la presente investigación.

Diagnóstico: Para la detección de Distemper canino se utilizaron los oligonucleótidos que amplifican un fragmento del gen que corresponde a la proteína de la nucleocápside de VDC, amplificando estos un fragmento de 427 pb como producto del RT-PCR y para el PCR anidado un fragmento de 149 pb (König, 2004). Las secuencias de oligonucleótidos para el RT-PCR y el PCR anidado se muestran en la tabla 2.

Amplificación de gen H: para la amplificación de el gen de la Hemaglutinina se utilizaron los oligonucleótidos H-F, H-R reportados por J. J. Zhao et al., 2010. Ambos oligonucleótidos amplifican un total de 1879 pares de bases. Las secuencias de estos oligonucleótidos se muestran en la tabla 2.

Amplificación de un fragmento del gen H: para la amplificación de un fragmento del gen de la Hemaglutinina se diseñaron los oligonucleótidos H-1 y H-2 (648 pb), basándonos en las secuencias reportadas en el GenBank® y con ayuda de software AmplifX, las secuencias de los oligonucleótidos se muestran en la tabla 2.

#### **3.2.4.1. Controles positivos y negativos**

Como control positivo se realizó una extracción ARN de la capa del virus Distemper canino obtenida a partir de la vacuna Novibac Puppy DP (Vacuna de virus vivo combinado, cada dosis contiene al menos de  $10^{5.0}$  DICT<sub>50</sub> del virus del Distemper canino cepa Ondersterpoort). En el caso de control negativo fue utilizada agua estéril (Milli-Q).

#### **3.2.5. RT-PCR**

##### **3.2.5.1. Transcripción inversa- Reacción en cadena de polimerasa y Reacción en cadena de polimerasa para el Diagnóstico del virus Distemper canino**

El RT-PCR se realizó en un solo paso mediante el uso del estuche comercial “SuperScript® III One-Step RT-PCR System with Platinum® Taq Dna Polymerase (Invitrogen®). El estuche contiene una mezcla de buffer 2X reacción Mix (el buffer contiene 0.4 mM por cada dNTP, 3.2 mM MgSO<sub>4</sub>), la enzima transcriptasa reversa (RT) y la Taq-polimerasa SuperScript™ II RT/Platinum® TaqMix. Los oligonucleótidos utilizados fueron CDV-N6 y CDV-N7 (tabla 2) el fragmento amplificado corresponde a 427 pb del gen de la

nucleocápside. Para realizar el procedimiento se colocaron en un microtubo para PCR de 0.2 ml ambos oligonucleótidos con el total de 25 picomoles cada uno (1.5  $\mu$ l de 16.66  $\mu$ M de los oligonucleótidos CDV-N6 y CDV-N7 y 1.5  $\mu$ l de agua para PCR, a esta pre-mezcla se le agregaron 2.5  $\mu$ l de ARN, llevándose a cabo un proceso de desnaturalización inicial de 94°C durante 3 minutos, seguido de un lapso de enfriamiento a 4°C. A continuación se agregó al tubo de PCR con la muestra de ARN previamente desnaturalizada, la cantidad de 12.5  $\mu$ l de buffer 2X reacción Mix (0.4 mM por cada dNTP y 2.4 mM MgSO<sub>4</sub>), 0.5  $\mu$ l RT/PlatinumTaqMix, y 5  $\mu$ l de agua Milli-Q, obteniendo un volumen total de 25  $\mu$ l por reacción. El proceso de retrotranscripción se llevó a cabo en un ciclo de 50°C por 30 minutos y 94°C por un minuto, seguido de 30 ciclos de PCR: 94°C por 30 segundos, 55°C durante 30 segundos y por ultimo 72°C por 30 segundos. Los productos de PCR fueron almacenados hasta su uso.

### **3.2.6 PCR punto final**

#### **3.2.6.1 PCR Anidado para el diagnóstico del virus Distemper canino**

El PCR anidado se realizó con el Kit Platinum® PCR SuperMix (Invitrogen®) (22U/ml de complejo recombinante de Taq ADN polimerasa, 22 mM Tris-HCL (pH 8.4)l , 55 mM KCL, 1.65 mM MgCl<sub>2</sub>, 220  $\mu$ M de cada dNTP, y estabilizadores).

Para realizar el PCR anidado se colocó en un tubo para PCR, 22.5  $\mu$ l de PCR Super Mix (22U/ml de complejo recombinante de Taq ADN polimerasa, 22 mM Tris-HCL (pH 8.4), 55 mM KCL, 1.65 mM MgCl<sub>2</sub>, 220  $\mu$ M de cada dNTP, y estabilizadores), 25 picomoles de los oligonucleótidos N8 y N9 (1.5  $\mu$ l de 16.66  $\mu$ M de oligonucleótidos N8 y N9) así como 1.25  $\mu$ l del producto de RT-PCR teniendo un volumen total de 26.75  $\mu$ l por reacción.

Posteriormente éste se sometió a un ciclo de desnaturalización de 94°C por 2 minutos seguido por 30 ciclos de una desnaturalización de 94°C durante 30 segundos, 55°C por 30 segundos y una extensión 72°C durante 30 segundos, para terminar en una extensión final a una temperatura de 72°C durante 5 minutos, por último se mantuvo incubando a una temperatura de 4°C y almacenados hasta su uso.

### **3.2.6.2 RT-PCR Y PCR para amplificación del gen de la Hemaglutinina**

La síntesis del cDNA se realizó usando el kit RevertAid™ Premium First Strand cDNA Synthesis (Thermo Scientific). El estuche contiene RevertAid RT (200 U/μL), inhibidor de RNasas RiboLock (20 U/μL), buffer 5X reacción (250 mM Tris-HCl (pH 8.3), 250 mM KCl, 20 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM DTT), dNTP Mix (10 mM), Oligo(dT)<sub>18</sub> Primer (100 μM), Random Hexamer Primer (100 μM) y agua libre de nucleasas 2x1.25 ml. En un microtubo para PCR se colocó 10 μl de ARN, se agrega 1 μl de agua libre de nucleasas y 1 μl de Oligo(dT)<sub>18</sub> Primer (100 μM), posteriormente el ARN se colocó en el termociclador y fue desnaturalizado a 65°C por 5 minutos e incubado en 4°C durante 5 minutos a continuación de agregar 4 μl de buffer 5X reacción (250 mM Tris-HCl (pH 8.3), 250 mM KCl, 20 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM DTT), 2 μl de dNTP Mix (10 mM), 1 μl de inhibidor de RNasas RiboLock (20 U/μL) y 1 μl de RevertAid RT (200 U/μL) y se procedió a la retrotranscripción, 42°C por 30 minutos y la reacción termina en 70°C durante 5 minutos. Los productos de la reacción de PCR serán almacenados hasta su uso.

La PCR para amplificación de gen de la Hemaglutinina se realizó con el Kit Maxima Hot start Taq DNA Polymerase (Thermo Scientific) el cual contiene buffer 10X Maxima Hot Start Taq (200 mM Tris-HCl (pH 8.3 at 25°C), 200 mM KCl, 50 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), Maxima Hot Start Taq DNA Polymerase y MgCl<sub>2</sub> (25 mM). Se colocó en un microtubo

para PCR 2.5  $\mu$ l de buffer 10X Maxima Hot Start Taq (200 mM Tris-HCl (pH 8.3 at 25°C), 200 mM KCl, 50 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), 1  $\mu$ l de dNTP Mix (10 mM), 1  $\mu$ l de cada oligonucleótido H-R, H-F (25  $\mu$ M), 1  $\mu$ l de MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 3  $\mu$ l de cDNA, 0.5  $\mu$ l de Maxima Hot Start Taq DNA Polymerase y 14  $\mu$ l de agua libre nucleasas, para hacer un volumen total de 25  $\mu$ l. La reacción se colocó en el termociclador y se sometió a una desnaturalización inicial 95°C por 4 minutos seguido por 35 ciclos de una desnaturalización de 95°C durante 30 segundos, 48.2°C por 30 segundos una extensión de 72°C durante 2 minutos; para terminar en una extensión final de 72°C por 10 minutos. El producto de PCR fue almacenado hasta su uso.

### **3.2.6.3. Diseño de oligonucleótidos**

Los oligonucleótidos utilizados para la amplificación de un fragmento del gen de la Hemaglutinina fueron elaborados en base a las secuencias de referencia obtenidas del GenBank. Estos oligonucleótidos fueron analizados por el software Amplifx 1.7.0. (<http://crn2m.univ-mrs.fr/pub/amplifx-dist>).

### **3.2.6.4 PCR anidado para la amplificación de un fragmento del gen de la Hemaglutinina**

El PCR anidado se realizó con el estuche comercial “Maxima Hot start Taq DNA Polymerase” (Thermo Scientific) el cual contiene buffer 10X Maxima Hot Start Taq (200 mM Tris-HCl (pH 8.3 at 25°C), 200 mM KCl, 50 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), Maxima Hot Start Taq DNA Polymerase y MgCl<sub>2</sub> (25 mM). Se colocó en un microtubo para PCR 2.5  $\mu$ l de buffer 10X Maxima Hot Start Taq (200 mM Tris-HCl (pH 8.3 at 25°C), 200 mM KCl, 50 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), 1  $\mu$ l de dNTP Mix (10 mM), 1  $\mu$ l de cada oligonucleótido H-1, H-2 (25  $\mu$ M),

1 µl de MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 2 µl del amplificado de la PCR para el gen de la Hemaglutinina, 0.5 µl de Maxima Hot Start Taq DNA Polymerase y 15 µl de agua libre nucleasas, para hacer un volumen total de 25 µl. La reacción se colocó en el termociclador y se sometió a una desnaturalización inicial 95°C por 4 minutos seguido por 35 ciclos de una desnaturalización de 95°C durante 30 segundos, 48.2°C por 30 segundos una extensión de 72°C durante 2 minutos; para terminar en una extensión final de 72°C por 10 minutos. El producto de PCR fue almacenado hasta su uso.

**Tabla 2. Descripción de los oligonucleótidos utilizados para el diagnóstico y filogenia del VDC en el área metropolitana de Monterrey Nuevo León México**

Nombre	Secuencia (5' → 3')	Autor	Orientación	Propósito
N6	CGACTCGGAGATGAGAAGGTG	König et al., 2004	Sentido	Diagnóstico
N7	CAATGGGTAGGACCCTGCAC	(427 pb)	Antisentido	
N8	GATCCCCAGGGAACAAGCC	König et al., 2004	Sentido	
N9	TCCGGAAAACATCATGCAACC	(142 pb)	Antisentido	
H-F	TTAGGGCTCAGGTAGTCCA	Zhao et al., 2010 (1879	Sentido	Filogenia
H-R	CTAAGKCCAATTGARATGTGT	pb)	Antisentido	
H-1	ATGTGAACCAAACGTCATGG	González-Linares, A.B.	Sentido	
H-2	ACGGTTACATGAGAATCTTATACGGAC	Presente trabajo (648 pb)	Antisentido	

### 3.2.7. Electroforesis

Los productos de PCR fueron separados mediante electroforesis en el gel de agarosa al 1.5% durante 90 minutos a 90 volts constantes. La corrida se realizó con Buffer para electroforesis ARN/ADN: SB 1X (0.30% Ácido bórico, 0.03% NaOH). El gel fue teñido con azul de bromofenol y las bandas fueron visualizadas por el software Doc-ItLS (Image Analysis Software 6.5)

### 3.2.8. Secuenciación

Los productos de PCR fueron enviados en tubos para PCR con 10 µl de cada producto de PCR y 10 µl de oligonucleótido H-1y H-2 (5 pm/µ) a Macrogen USA ubicado en Maryland, USA donde fueron purificados y secuenciados en ambos sentidos.

**Tabla 3. Secuencias nucleotídicas utilizadas en los análisis filogenéticos.**

Nº	NOMBRE	Nº DE ACCESO	PAIS	LINAJE	SECUENCIA	ESPECIE
1		FJ392651	ARGENTINA	SUR DE AMERICA 2	HEMAGLUTININA	CANINO
2		FJ392652	ARGENTINA	EUROPA/SUR DE AMERICA 1	HEMAGLUTININA	CANINO
3		KC257463	ARGENTINA	SUR DE AMERICA 2	HEMAGLUTININA	CANINO
4		KC257464	ARGENTINA	SUR DE AMERICA 2	HEMAGLUTININA	CANINO
5		EU098102	BRASIL	EUROPA/SUR DE AMERICA 1	HEMAGLUTININA	CANINO
6		EU098103	BRASIL	EUROPA/SUR DE AMERICA 1	HEMAGLUTININA	CANINO
7		EU098104	BRASIL	EUROPA/SUR DE AMERICA 1	HEMAGLUTININA	CANINO
8		EU098105	BRASIL	EUROPA/SUR DE AMERICA 1	HEMAGLUTININA	CANINO
9		AF172411	CHINA	ARTICO	HEMAGLUTININA	CANINO
10		KF835414	COLOMBIA	SUR DE AMERICA 3	HEMAGLUTININA	CANINO

11			COLOMBIA	SUR DE AMERICA 3	HEMAGLUTININA	CANINO
		KF835419				
12			COLOMBIA	SUR DE AMERICA 3	HEMAGLUTININA	CANINO
		KF835421				
13			COLOMBIA	SUR DE AMERICA 3	HEMAGLUTININA	CANINO
		KF835423				
14			COLOMBIA	SUR DE AMERICA 3	HEMAGLUTININA	CANINO
		KF835425				
15	CONVAC		VACUNA	AMERICA 1	HEMAGLUTININA	_____
		Z35493				
16			DINAMARCA	EUROPA/SUR DE AMERICA 1	HEMAGLUTININA	
		AF478544				
17			DINAMARCA	EUROPA/SUR DE AMERICA 1	HEMAGLUTININA	
		AF478550				
18			DINAMARCA	AMERICA 2	HEMAGLUTININA	
		KF430371				
19			DINAMARCA	AMERICA 2	HEMAGLUTININA	
		KF430373				
20			DINAMARCA	EUROPA SILVESTRE	HEMAGLUTININA	MINK
		Z47759				
21			ALEMANIA	EUROPA/SUR DE AMERICA 1	HEMAGLUTININA	CANINO
		X85000				
22			GRECIA	ARTICO	HEMAGLUTININA	CANINO
		Z47760				
23			GRECIA	EUROPA/SUR DE AMERICA 1	HEMAGLUTININA	CANINO
		JN008893				
24			GRECIA	EUROPA/SUR DE AMERICA 1	HEMAGLUTININA	CANINO
		JN008901				
25			GRECIA	EUROPA/SUR DE AMERICA 1	HEMAGLUTININA	CANINO
		JN008902				
26			GRECIA	ARTICO	HEMAGLUTININA	CANINO
		JN008903				
27			GRECIA	EUROPA/SUR DE AMERICA 1	HEMAGLUTININA	CANINO
		JN008904				
28			HUNGRIA	EUROPA SILVESTRE	HEMAGLUTININA	CANINO
		DQ889187				
29			HUNGRIA	ROCK BORN LIKE	HEMAGLUTININA	_____
		DQ889189				
30			ITALIA	ARTICO	HEMAGLUTININA	CANINO
		DQ226088				
31			ITALIA	EUROPA SILVESTRE	HEMAGLUTININA	CANINO
		DQ228166				
32			ITALIA	EUROPA/SUR DE AMERICA 1	HEMAGLUTININA	CANINO
		DQ494317				
33			JAPON	ASIA 2	HEMAGLUTININA	CANINO
		AB025270				
34			JAPON	ASIA 1	HEMAGLUTININA	CANINO
		AB025271				
35			JAPON	ASIA 2	HEMAGLUTININA	CANINO
		AB212730				
36			JAPON	ASIA1	HEMAGLUTININA	CANINO
		AB212965				

37		Y297453	JAPON	ASIA 2	HEMAGLUTININA	CANINO
38		D85753	JAPON	ASIA 1	HEMAGLUTININA	CANINO
39		D85754	JAPON	ASIA 1	HEMAGLUTININA	CANINO
40		D85755	JAPON	ASIA 1	HEMAGLUTININA	CANINO
41	LEDERLE	EF418782	VACUNA	AMERICA 1	HEMAGLUTININA	_____
42	MX1		MEXICO	NORTE AMERICA	SECUENCIA PARCIAL (611 PB)4	CANINO
43	MX2		MEXICO	NORTE AMERICA	SECUENCIA PARCIAL (611 PB)	CANINO
44	MX3		MEXICO	NORTE AMERICA	SECUENCIA PARCIAL (611 PB)	CANINO
45	MX4		MEXICO	NORTE AMERICA	SECUENCIA PARCIAL (611 PB)	CANINO
46	MX5		MEXICO	NORTE AMERICA	SECUENCIA PARCIAL (611 PB)	MAPACHE
47	MX6		MEXICO	NORTE AMERICA	SECUENCIA PARCIAL (611 PB)	MAPACHE
48	MX7		MEXICO	NORTE AMERICA	SECUENCIA PARCIAL (611 PB)	MAPACHE
49	MX9		MEXICO	NORTE AMERICA	SECUENCIA PARCIAL (611 PB)	CANINO
50	ONDESTERP ORT	AF378705	VACUNA	AMERICA 1	GENOMA COMPLETO	_____
51		DK88-1a		GRUPO EXTRENO	HEMAGLUTININA	_____
52		HM563057	PORTUGAL	EUROPA/SUR DE AMERICA 1	HEMAGLUTININA	LOBO IBERICO
53	ROCK BORN	GU810819	VACUNA	ROCK BORN LIKE	HEMAGLUTININA	_____
54	ROCK BORN CANDUR	GU266280	VACUNA	ROCK BORN LIKE	HEMAGLUTININA	_____
55		FJ461713	SUDÁFRICA	AFRICA	HEMAGLUTININA	CANINO
56		FJ461717	SUDÁFRICA	AFRICA	HEMAGLUTININA	CANINO
57		FJ461719	SUDÁFRICA	AFRICA	HEMAGLUTININA	CANINO
58		FJ461721	SUDÁFRICA	AFRICA	HEMAGLUTININA	CANINO
59		FJ461724	SUDÁFRICA	AFRICA	HEMAGLUTININA	CANINO
60	SNYDER HILL	AF259552	VACUNA	AMERICA1	HEMAGLUTININA	_____
61		JN215473	URUGUAY	EUROPA/SUR DE AMERICA 1	HEMAGLUTININA	CANINO

62	JN215474	URUGUAY	EUROPA/SUR DE AMERICA 1	HEMAGLUTININA	CANINO
63	JN215475	URUGUAY	EUROPA/SUR DE AMERICA 1	HEMAGLUTININA	CANINO
64	JN215476	URUGUAY	EUROPA/SUR DE AMERICA 1	HEMAGLUTININA	CANINO
65	JN215477	URUGUAY	EUROPA/SUR DE AMERICA 1	HEMAGLUTININA	CANINO
66	AY386315	USA	EUROPA/SUR DE AMERICA 1	HEMAGLUTININA	HURON
67	AY649446	USA	AMERICA 2	HEMAGLUTININA	MAPACHE
68	AY964110	USA	NORTE AMERICA	HEMAGLUTININA	CANINO
69	AY964112	USA	ARTICO	HEMAGLUTININA	CANINO
70	JN836734	USA	NORTE AMERICA	HEMAGLUTININA	MARTA PESCADORA
71	JN836737	USA	NORTE AMERICA	HEMAGLUTININA	MARTA PESCADORA
72	Z47762	USA	AMERICA 2	HEMAGLUTININA	CANINO
73	Z54156	USA	AMERICA 2	HEMAGLUTININA	LEOPARDO
74	Z54166	USA	AMERICA 2	HEMAGLUTININA	LEOPARDO

### 3.2.9 Análisis de Bioinformática

#### 3.2.9.1 Edición de secuencias parciales del gen de la Hemaglutinina

Las secuencias fueron analizadas y editadas con el software Molecular Evolutionary Genetics Analysis 6 (MEGA 6) (Tamura et al., 2011). Se analizaron un total de 8 secuencias con un total de 611 nucleótidos cada una, que codifican supuestamente a 203 aminoácidos de la proteína Hemaglutinina. Los fragmentos obtenidos del gen H fueron alineados con 66 secuencias pertenecientes a los 11 linajes reportados, incluyendo el linaje América 1 o Vacunal. El algoritmo utilizado para la alineación de las secuencias fue el

CrystalW, y el modelo p-distance con MEGA 6 (Tamura et al., 2011) para la estimación de la distancia genética.

### **3.2.9.2. Análisis filogenético**

El árbol filogenético fue realizado mediante un análisis Bayesiano en base al alineamiento de un fragmento del gen de la Hemaglutinina. Fue utilizado el software MrBayes 3.2.2 (Ronquist et al., 2012). El análisis de inferencia bayesiana fue realizado con el software MrBayes 3.2.2 usando el modelo GTR con distribución gamma. Para este método, dos análisis se llevaron a cabo en paralelo con 1,000,000 generaciones y un burn-in de 20 %. El archivo fue visualizado mediante FigTree v1.4.

### **3.2.9.3. Sitios de glucosilación**

Se realizó el análisis de las ocho secuencias que codifican un total de 203 aminoácidos, para la identificación de los sitios de glucosilación con ayuda del software Molecular Evolutionary Genetics Analysis 6 (MEGA 6). Principalmente se ubicaron los sitios donde se encontraba la secuencia N, X, S/T donde N pertenece a Arginina, X a cualquier aminoácido a excepción de Prolina y S pertenece a Serina y T a Triptófano.

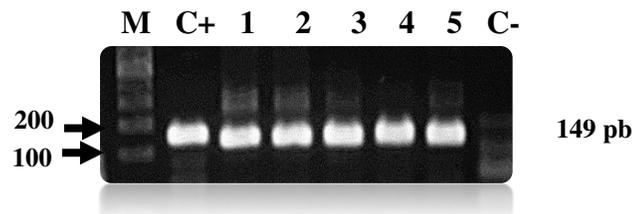
### **3.2.9.4. Análisis de presiones selectivas**

Se sometió un alineamiento de 69 secuencias de un fragmento del gen de la Hemaglutinina a una prueba de selección natural. El análisis se elaboró utilizando el método "Single Likelihood Ancestor Counting SLAC", con el modelo de evolución (HKY85), en el programa HyPhy implementado en el sitio web Datamonkey ([www.datamonkey.org](http://www.datamonkey.org)). Los valores de significancia utilizados en los análisis fueron de ( $\alpha$ ) 0,25 y 0,1.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 RT-PCR y PCR anidado para el diagnóstico del virus Distemper canino

El resultado del RT-PCR y el PCR anidado que fue realizado para la detección de VDC, se obtuvo la amplificación del gen que codifica para la proteína de la nucleocápside de VDC, obteniendo un amplicón de 427 pb como resultado del RT-PCR y un amplicón de 149 pb en el PCR anidado de las ocho muestras procesadas. Los amplificadores de cuatro muestras de pulmón canino se muestran en la Figura 4.

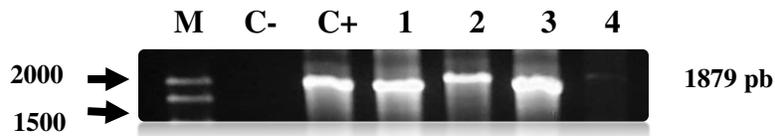


**Figura 4. Electroforesis de los productos amplificados del RT-PCR y PCR anidado para el VDC.** Se observa un amplificado de 149 pb del gen de la proteína N del VDC mediante PCR anidado. C+ control negativo; C+ control positivo; M. marcador de peso molecular 100-1000 pb; 1-4 muestras de pulmón canino.

### 4.2 RT-PCR y PCR para la amplificación del gen de la Hemaglutinina

El resultado del RT-PCR y el PCR que fue realizado para la amplificación del gen de la Hemaglutinina, se obtuvo la amplificación del gen que codifica para la proteína Hemaglutinina, obteniendo un amplicón de 1879 pb de las ocho secuencias procesadas.

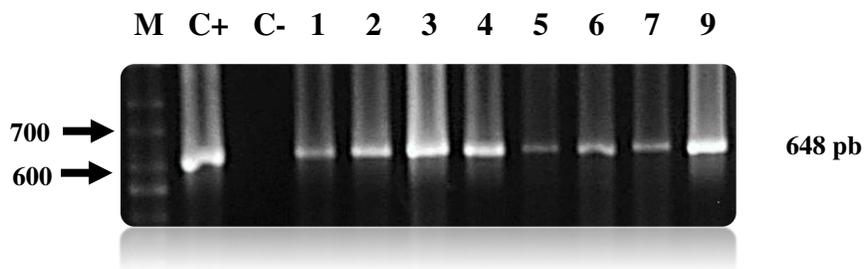
Figura 5



**Figura 5. Electroforesis de los productos amplificados del PCR para el gen de la Hemaglutinina.** Se observa un amplificado de 1879 pb del gen de la Hemaglutinina del VDC mediante PCR C+ control negativo; C+ control positivo; M. marcador de peso molecular 100-2000 pb; 1-4 muestras de pulmón canino.

#### 4.3 PCR anidado para la amplificación de fragmento del gen de la Hemaglutinina.

El resultado del PCR anidado que fue realizado para la amplificación de un fragmento del gen de la Hemaglutinina, se obtuvo una amplificación de un fragmento que codifica para la proteína Hemaglutinina, obteniendo un amplicón de 648 pb de las ocho muestras procesadas.



**Figura 6. Electroforesis de los productos amplificados del PCR Anidado para el gen de la Hemaglutinina.** Se observa un amplificado de 648 pb de un fragmento del gen de la Hemaglutinina del VDC mediante PCR anidado; C+ control negativo; C+ control positivo; M. marcador de peso molecular 100-1000 pb; 1-4 muestras de pulmón canino; 5-7 muestras de hígado, intestino y pulmón de mapache; muestra 9 de hisopado nasal y conjuntival de canino.

## **4.4 Análisis filogenéticos**

### **4.4.1 Análisis del gen parcial de la Hemaglutinina**

A partir de las ocho secuencias parciales del gen de la Hemaglutinina de 611 pb (203 aminoácidos) obtenidas durante la presente investigación y 66 secuencias nucleotídicas obtenidas del GenBank® se llevó a cabo el análisis de distancia genética y filogenético

De acuerdo al análisis filogenético, se observó una topología que revelaba la formación de 12 linajes, 11 de los cuales ya habían sido reportados con anterioridad por otros grupos de investigadores. Los linajes fueron: América 1, América 2, Asia 1, Asia 2, Europa/Sur de América 1, Europa silvestre, Rock born like, Sur de América 2, Sur de América 3, África y “Norte América”. Las ocho secuencias incluidas en el presente estudio revelaron que este grupo forma parte de un clado, de “Norte América”, donde se incluyeron también las secuencias JN836734 (cepa Fisher-1), JN836737 (aislado Fisher-4) y AY964110 (aislado 19876) reportados en los EUA en los años 2005 y 2012. La separación filogenética de este linaje fue soportado con un valor de Bootstrap de 100%. Asimismo, se observa que dentro de este clado, un subclado, con las muestras de obtenidas a partir del mapache, JN836734 (cepa Fisher-1), JN836737 (aislado Fisher-4) el cual fue nombrado como “Norte América Silvestre” teniendo valor de Bootstrap de 100%.

El análisis comparativo de la secuencia de nucleótidos, de las secuencias obtenidas en el presente trabajo, con cepas del linaje América y con cepas Vacúnales reveló un total de 71 cambios nucleótidos y 37 cambios aminoácidos, respecto a las cepas del linaje América 1 o Vacunal. Se observó 100% de similitud entre las secuencias MX5, MX6, MX7 aisladas de tres diferentes órganos de un mapache. Por otra parte la identidad nucleotídica de estas secuencias, que resultó del análisis del linaje Norte América fue desde 99.97%- 99.99% y 99.65%-99.99 de identidad aminoácídica. Considerando de manera ascendente la identidad nucleotídica de estas secuencias se presentó de la siguiente manera: 99.97% con Europa

Silvestre, 99.96% en Rock Born Like, 99.96% en América 2, 99.66% en Europa/Sur de América 1, 99.95% en Sur de América 2, 99.95% en Asia 2, 99.948% en Sur de América 3, 99.94% en Ártico, 99.94% en África, 99.93% en Asia 1 y 99.92% en América 1 o Vacunal.

La identidad aminoácídica se presentó de la siguiente manera: 99.98% con Europa Silvestre, 99.96% en Rock Born Like, 99.97% en América 2, 99.98% en Europa/Sur de América 1, 99.97% en Sur de América 2, 99.94% en Asia 2, 99.94% en Sur de América 3, 99.96% en Ártico, 99.96% en África, 99.944% en Asia 1 y 99.92% en América 1 o Vacunal.

**Tabla 4. Análisis de distancia nucleotídica de las secuencias de los 12 linajes del VDC.**

	SA2	E/SA1	ART	SA3	A1	A2	ES	RL	AS1	AS2	NA	AF
SUR DE AMERICA 2												
EUROPA/SUR DE AMERICA 1	0.041											
ARTICO	0.052	0.034										
SUR DE AMERICA 3	0.061	0.041	0.058									
AMERICA 1	0.073	0.065	0.059	0.074								
AMERICA 2	0.034	0.019	0.033	0.046	0.057							
EUROPA SILVESTRE	0.032	0.016	0.025	0.037	0.050	0.014						
ROCKBORN LIKE	0.030	0.022	0.034	0.042	0.057	0.017	0.013					
ASIA 2	0.078	0.060	0.059	0.081	0.081	0.058	0.048	0.056				
ASIA 1	0.047	0.026	0.041	0.058	0.073	0.028	0.026	0.030	0.071			
NORTE AMERICA	0.049	0.039	0.057	0.052	0.079	0.038	0.032	0.037	0.072	0.050		
AFRICA	0.057	0.044	0.036	0.056	0.068	0.041	0.035	0.040	0.061	0.052	0.063	

\*Se muestra la cantidad de diferencias de nucleotidos por sitio de entre las secuencias, El análisis se realizó mediante el modelo *p*-distance e incluyó las 73 secuencias de nucleótidos. Se encuentran resaltadas en color rosa las distancias nucleotídicas del linaje Norte América respecto a los otros 11 linajes descritos previamente

**Tabla 5. Análisis de distancia nucleotídica de los aislados de esta investigación.**

	MX1	MX2	MX3	MX4	MX5	MX6	MX7	MX9
MX1								
MX2	0.008							
MX3	0.013	0.008						
MX4	0.012	0.007	0.002					
MX5	0.022	0.017	0.022	0.020				
MX6	0.022	0.017	0.022	0.020	0.000			
MX7	0.022	0.017	0.022	0.020	0.000	0.000		
MX9	0.008	0.003	0.008	0.007	0.017	0.017	0.017	

\*Las cepas de mapache se encuentran resaltadas con color rosa.

**Tabla 6.**  
**Análisis de distancia aminoácídica de las secuencias de los 12 linajes del VDC.**

	SA2	E/SA1	ART	SA3	A1	A2	ES	RL	AS1	AS2	NA	AF
SUR_DE_AMERICA												
EUROPA/SUR_DE_AMERICA_1	0.022											
ARTICO	0.034	0.026										
SUR_DE_AMERICA_3	0.051	0.039	0.061									
AMERICA_1	0.062	0.062	0.058	0.089								
AMERICA_2	0.025	0.020	0.034	0.057	0.061							
EUROPA_SILVESTRE	0.016	0.014	0.022	0.048	0.050	0.019						
ROCK_BORN_LIKE	0.026	0.028	0.041	0.059	0.078	0.031	0.024					
ASIA_2	0.057	0.050	0.045	0.081	0.081	0.057	0.039	0.064				
ASIA_1	0.029	0.020	0.038	0.058	0.066	0.028	0.019	0.036	0.053			
NORTE_AMERICA	0.031	0.022	0.043	0.056	0.075	0.033	0.028	0.036	0.056	0.039		
AFRICA	0.033	0.029	0.022	0.054	0.059	0.035	0.024	0.041	0.039	0.040	0.043	

\*Se muestra la cantidad de diferencias de aminoácidos por sitio de entre las secuencias, El análisis se realizó mediante el modelo p-distance e incluyó las 73 secuencias de nucleótidos. Se encuentran resaltadas en color rosa las distancias aminoácidos del linaje Norte América respecto a los otros 11 linajes descritos previamente

**Tabla 7. Análisis de distancia aminoácídica de los aislados de esta investigación.**

	MX1	MX2	MX3	MX4	MX5	MX6	MX7	MX9
MX1								
MX2	0.010							
MX3	0.030	0.020						
MX4	0.025	0.015	0.005					
MX5	0.025	0.015	0.034	0.030				
MX6	0.025	0.015	0.034	0.030	0.000			
MX7	0.025	0.015	0.034	0.030	0.000	0.000		
MX9	0.010	0.000	0.020	0.015	0.015	0.015	0.015	

\*Las cepas de mapache se encuentran resaltadas con color rosa.

#### 4.4.2. Análisis para la detección y ubicación de los potenciales sitios de glucosilación

Los sitios de glucosilación observados fueron representados por N, I, S – N, G, T – N, S, T en las posiciones 422-424, 456-458, 587-589 de las secuencias aminoácidas. No fueron encontrados sitios adicionales de glucosilación a los reportados anteriormente encontrados en las cepas pertenecientes al linaje América o Vacunal (Lederle EF418782, Snyder Hill AF259552, Convac Z35493, Ondesterport AF378705). Los sitios de glucosilación observados fueron representados por N, I, S – N, G, T – N, S, T en las posiciones 422-424, 456-458, 587-589 de las secuencias aminoácidas.

#### 4.4.3. Presiones selectivas

En el análisis de selección natural se encontró selección positiva y se detectó siete sitios de selección positiva que correspondieron a los codones que: 401, 412, 417, 506, 519, 530, 549. Los cambios en los sitios encontrados en las secuencias aminoácidas de las cepas mexicanas únicamente fueron 401, 417, 506, 530, 549. Los valores de significancia utilizados en los análisis fueron de ( $\alpha$ ) 0,25 y 0,1.

**Tabla 8. Análisis de presiones selectivas**

Codon	dN-dS	p-value	Cambio aminoácido
401	3.99569	0.145216	G/R
<b>412</b>	<b>4.68087</b>	<b>0.0888531</b>	-----
417	4.55949	0.104024	E/D
506	3.79947	0.209282	T/I
519	3.85302	0.179178	-----
530	5.92317	0.175293	D/S
549	4.62339	0.132466	-----

\*Representación de sitios sujetos a selección positiva en Hemaglutinina, se encuentra resaltado el codón 412 con un valor de ( $\alpha$ ) 0,1 y el resto de los codones el valor de ( $\alpha$ ) 0,25; la columna resaltada en gris son los cambios aminoácidos de las secuencias mexicanas.



	1490	1500	1510	1520	1530	1540	1550	1560	1570	1580													
ON/AF378705	A C A T C	T C A A	A T T A T	A G A T A	G A G A T	G T C C T	C A T T	G A G T C	C A A T	A T A G T	G G T G T T	G C C T A	C A C A G A	G T T T T	A G A T A T	G T C A	T A G C A A C	G T A T G A	C A T A T C	A C G A			
SH/AF259552	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.		
CV/Z35493	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.		
LED/EF418782	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.		
MX1	.	C	G	G	A	.	T	T	.	.	.	.	.	.	.	.	G	A	.	.	C	G	
MX2	.	C	G	G	A	G	T	T	C	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	G
MX3	.	C	G	G	A	.	T	T	C	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	G
MX4	.	C	G	G	A	.	T	T	C	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	G
MX5	.	C	G	G	A	.	T	T	C	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	G
MX6	.	C	G	G	A	.	T	T	C	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	G
MX7	.	C	G	G	A	.	T	T	C	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	G
MX9	.	C	G	G	A	.	T	T	C	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	G

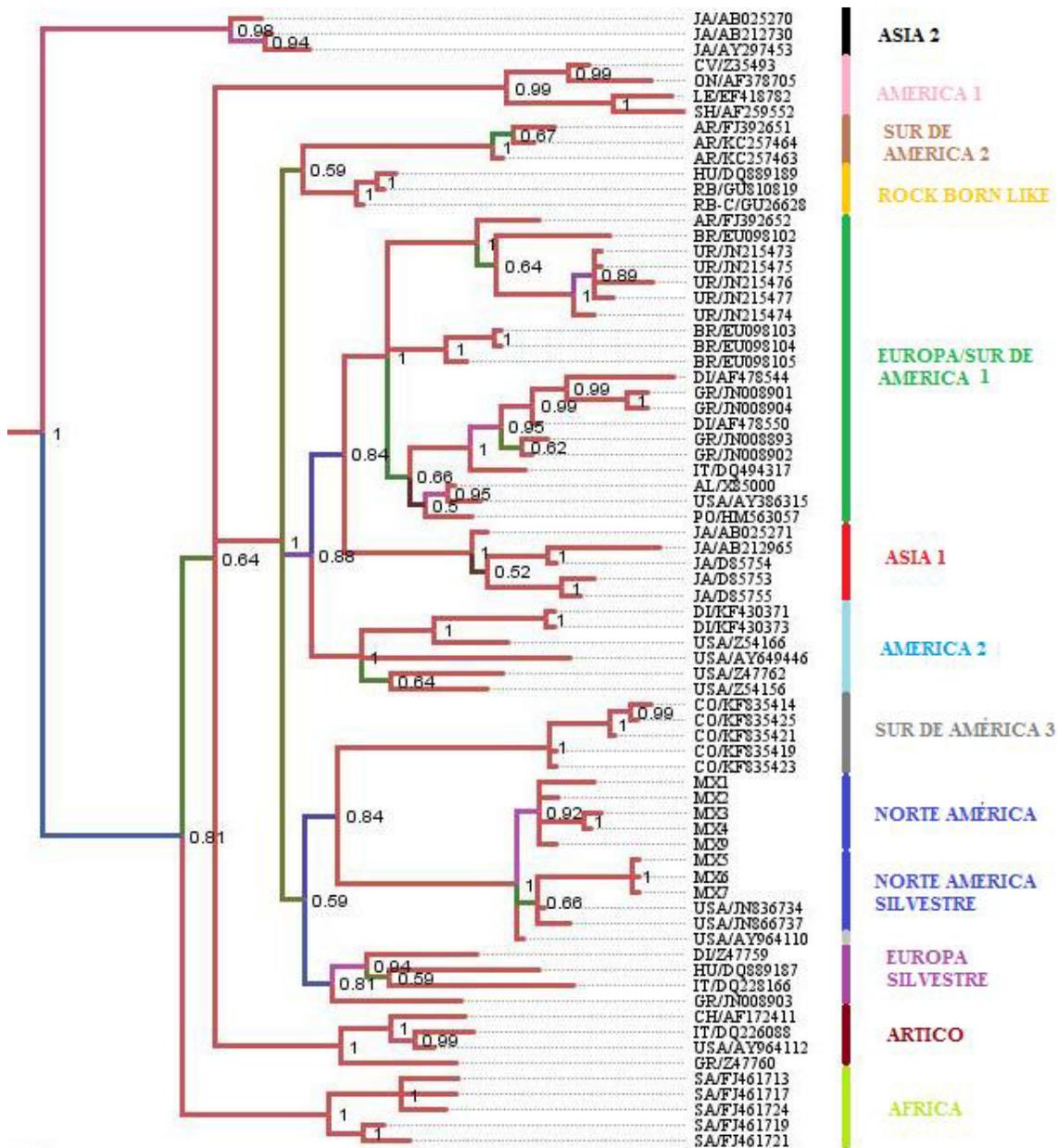
	1590	1600	1610	1620	1630	1640	1650	1660	1670	1680			
ON/AF378705	A G T G	A T C A T	G C G A T	T G T T T A	T T A T G T	T T A T G A C C C A	A T C	C G G A C G A T T T	C T T A T A C G	C A C C C A T T T A	G A C T A A C T A C C A A	G G G T A G	G C C T G A T T T C C T A A G G
SH/AF259552	A	.	.	.	.	.	T	.	.	.	T	.	.
CV/Z35493	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
LED/EF418782	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
MX1	G A C A	.	C	C	C	C	T	T	T	T	A	A	
MX2	G A C A	.	C	C	C	C	T	T	T	T	A	A	
MX3	G A C A	.	C	C	C	C	T	T	T	T	A	A	
MX4	G A C A	.	C	C	C	C	T	T	T	T	A	A	
MX5	G A C A	.	C	C	C	C	T	T	T	T	A	A	
MX6	G A C A	.	C	C	C	C	T	T	T	T	A	A	
MX7	G A C A	.	C	C	C	C	T	T	T	T	A	A	
MX9	G A C A	.	C	C	C	C	T	T	T	T	A	A	

	1690	1700	1710	1720	1730	1740	1750	1760	1770	1780	1790
ON/AF378705	A T T G A A T G T T T T G T	G T G G G A T G A	C A	A T T T G T G G T G T C A C C A A A T T	T A C A	G A T T C G A G G C T	G A C A T C	G C C A A C T C T A C A A C	C A G T G T T G A G A	A T T T A G T C C G	
SH/AF259552	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
CV/Z35493	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
LED/EF418782	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
MX1	.	T	T	G	O	C	C	A	T	.	.
MX2	.	T	T	G	O	C	C	A	T	.	.
MX3	.	T	T	G	O	C	C	A	T	.	G
MX4	.	T	T	G	O	C	C	A	T	.	G
MX5	.	T	T	G	O	C	C	A	T	T	.
MX6	.	T	T	G	O	C	C	A	T	T	.
MX7	.	T	T	G	O	C	C	A	T	T	.
MX9	.	T	T	G	O	C	C	A	T	T	.

**Figura 7. Alineamiento de las secuencias de 611 nucleótidos que pertenecen al gen la Hemaglutinina.** En esta figura se muestran los 8 aislados de este trabajo de investigación procedentes de Monterrey y su área metropolitana en Nuevo León, México así como la cepa vacunal Ondesterport. Están resaltados con amarillo los sitios donde se identifican cambios nucleotídicas respecto a la cepa vacunal.



**Figura 8. Alineamiento de las secuencias de 203 aminoácidos que pertenecen al gen de la Hemaglutinina.** Se observan los 8 aislados de trabajo de investigación procedentes de Monterrey y su área metropolitana, Nuevo León, México así como la cepa vacunal Ondesterport. Se encuentran resaltados en amarillo los cambios aminoácidas comparados a la cepa vacunal Ondesterport. Se identificaron los sitios de N-glicosilación y fueron resaltados con un recuadro.



**Figura 9. Relación filogenética de entre 74 cepas del VDC basada en un fragmento de 611 nucleótidos del gen de la Hemaglutinina.** El árbol filogenético fue inferido por el método de análisis de Bayesiano. Se muestran los 12 linajes de VDC. Cada secuencia está identificada por su número de acceso al GenBank® y la ciudad de procedencia. Las abreviaturas de los países de procedencia: AR; Argentina, BR; Brasil, CH; China, CO; Colombia, DI; Dinamarca, AL; Alemania, GR; Grecia, HU; Hungría, IT; Italia, JA; Japón, PO; Portugal, AF; Sudáfrica, UR; Uruguay, USA; Estados Unidos de América, MX; México.

## 5. DISCUSIÓN

El Distemper canino es una enfermedad multisistémica de alto impacto a nivel mundial en caninos y otras especies, presenta altos índices de morbilidad y de mortalidad. Por este motivo se inició con el uso de vacunas en base de virus vivo modificado a partir de los años 50, con esto se logró controlar la alta incidencia de brotes de VDC a nivel mundial. En las últimas décadas, datos anecdóticos entre la comunidad de médicos veterinarios, se sabe que esto no ha detenido por completo la propagación del VDC ya que se siguen presentando brotes aun en caninos vacunados, esto y facilidad del VDC de pasar la barrera entre especies han sido uno de los motivos de la incidencia actual del VDC. Debido a los brotes de VDC que han aumentado considerablemente a partir de finales de los 80'se inició con el estudio genético del virus, y para estudiar su diversidad genética se utilizaron glicoproteínas por variación genética: Hemaglutinina y la proteína de Fusión, demostrándose que existen diferentes linajes que están distribuidos generalmente por zonas geográficas (Espinal et al., 2014; Negrao et al., 2013). Por otra parte, México no queda exento de este problema así que en el presente trabajo se planteó el objetivo de caracterizar genéticamente una de las proteínas más variables en el VDC: la glicoproteína Hemaglutinina. Se realizó un RT-PCR y un PCR anidado a partir de muestras clínicas de 5 caninos con un calendario parcial y completo de vacunación y fueron diagnosticados positivos a VDC, fue amplificado un fragmento de 148 pb pertenecientes al gen N, comúnmente usado para el diagnóstico de VDC por ser un gen altamente conservado. Partiendo del diagnóstico procedimos con la obtención de cDNA a partir de las extracciones RNA que se obtuvieron con Oligo(dT)<sub>18</sub> Primer (100 µM) a diferencia de investigaciones atrás los cuales realizaban RT-PCR mediante oligonucleótido específico o

hexámeros aleatorios (Espinal et al., 2014), lo cual supone encontramos el virus en replicación. Posteriormente se estandarizo la técnica de PCR tiempo final para la amplificación del gen completo de la Hemaglutinina (Negrao et al., 2013).

El fragmento de 611 nucleótidos fue suficiente para separar en 12 linajes las secuencias de resultantes de este trabajo de investigación y las de referencias obtenidas del GenBank con un soporte estadístico aceptable.

Anteriormente se han realizado con éxito análisis filogenéticos utilizando secuencias parciales del gen de la Hemaglutinina (Calderon et al., 2007; Guo et al., 2013; Hashimoto et al., 2001; Gamiz, et al., 2011). Las ocho secuencias obtenidas en el presente fueron ubicadas en el linaje “Norte América” con un soporte estadístico del 100% donde también se encontraban secuencias aisladas de martas pescadoras y caninos procedentes de EUA (Keller et al., 2012; Pardo et al., 2005). Dentro de este linaje se encontró un subclado que denominamos “Norte América Silvestre” donde se incluían las tres secuencias aisladas del mapache, así como las secuencias de las martas pescadoras (Keller et al., 2012).

Mediante el análisis de divergencia nucleotídica y aminoácidica en el linaje Norte América reflejo valores de hasta 2.2% de variación nucleotídica y 3.4% de variación aminoácidica. Los valores se encuentran en el rango descrito anteriormente, donde se indica que valores menores al 4% de divergencia aminoácidica es considerado que dos aislamientos pertenecen al mismo linaje y valores mayores al 4% indican que pertenecen a linajes distintos (Bolt et al., 1997; Martella et al., 2006). Siguiendo con este análisis se encontraron divergencia nucleotídica y aminoácidica de 7.9% y 7.5% respectivamente, donde podemos observar la gran diferencia genética encontrada de cepas circulantes en la región y cepas vacúnales usadas y disponibles comercialmente. Estos cambios en

aminoácidos de la Hemaglutinina, claramente pueden intervenir directamente en la inmunización contra el VDC mediante vacunación, ya que está comprobado que las cepas vacunales usadas desde 1950 para el control del VDC son considerablemente diferentes a las circulantes en diferentes regiones del mundo (Espinal et al., 2014; Negrao et al., 2013; N. Sarute et al., 2014). Resultados similares se han descrito en otros trabajos de investigación, los cuales han demostrado que las cepas del VDC usadas en las vacunas están notablemente alejadas a nuevas cepas circulantes del VDC que recientemente han sido aisladas (Negrao et al., 2013; Woma et al., 2010). Debido a que existe una constante atenuación de vacunas producidas comercialmente y la presencia de otros agentes virales dentro de estas vacunas podría inducir a la deriva genética y consecuentemente, alterar la eficacia de la vacuna (Negrao et al., 2013). La identidad aminoácidica de las secuencias obtenidas a partir de animales afectados por el VDC mostró una amplitud de rango con las cepas de referencia con los rangos de los linajes descritos previamente por otros investigadores (Espinal et al., 2014). Como consecuencia de esto es factible considerar que la deriva genética demostrada, sea una de las causas en el aumento de los índices de incidencia del Distemper canino en poblaciones de caninos vacunados y parcialmente vacunados.

El análisis que se realizó a una parte del gen de la Hemaglutinina permitió acercarnos a conocer parcialmente las características genéticas del virus Distemper canino que circula en el área de metropolitana de Monterrey, N.L. y con ello se inició con una línea de investigación dedicada a conocer el posible impacto de este virus en los animales susceptible de esta zona. Por otro lado, se realizó un análisis para identificar los sitios de glucosilación ubicados en las secuencias aminoácidicas de las ocho secuencias aisladas en

este trabajo de investigación. No se encontraron diferencias en los sitios de glucosilación de las secuencias obtenidas lo cual contrasta con otras investigaciones las cuales identificaron nuevos sitios de glucosilación (Espinal et al., 2014; Nicolas Sarute, 2012).

Para poder determinar las presiones de selección que actúan en el gen fragmento del gen de la Hemaglutinina, se estimó el número de mutaciones *sinónimas* y *no-sinónimas* de cambios de nucleótidos por sitio; cuando  $dN > dS$ , esto era indicativo de selección positiva. Se encontraron siete sitios con mayores números de sustituciones *no-sinónimas*, los codones que presentaron selección positiva fueron: 401, 412, 417, 506, 519, 530, 549. Las sustituciones localizadas en el alineamiento aminoácida del fragmento del gen H de las secuencias mexicanas fueron las posiciones 401, 417, 506, 530 y 549. El análisis de las cepas del VDC ha sugerido que los residuos de aminoácidos 530 y 549 en la proteína H están asociados con la especificidad del hospedador (J. Zhao et al., 2014). Las sustituciones en estos dos puestos clave están relacionados con la transmisión entre especies, basado en la especificidad la proteína H glucosiladas participa en la unión al receptor y es mucho más variable que otras proteínas del VDC; lo que representa un gen adecuado para investigar la diversidad genética/antigénico del VDC (J. J. Zhao et al., 2010). El análisis de las cepas de la proteína H sugiere que los residuos de aminoácidos 530 y 549 en esta proteína están asociados con la especificidad del hospedador (J. Zhao et al., 2014). Las sustituciones en estos dos puestos clave están relacionadas con la transmisión entre especies, basado en la especificidad VDC-H para CD150/SLAM. En estudios anteriores se encontró que cuando la cepa del VDC de canino, pasó en hurones (*Mustela putorius*), la proteína H adquirió una mutación que conduce a la sustitución de tirosina a histidina en la posición de aminoácido 549. El VDC con histidina en el residuo 549 eran altamente virulenta para mapaches, en

comparación con las cepas que carecen de esta sustitución (J. Zhao et al., 2014). Las cepas de este trabajo de investigación nombradas como MX5, MX6, MX7 que fueron aislados de distintos órganos de un mapache presentaron esta sustitución de tirosina a histidina lo que sostiene lo descrito anteriormente. Se ha mencionado que la estructura tridimensional de la Hemaglutinina de los *Morbillivirus* podría estar enmascarando de los epítomos antigénicos por los residuos de azúcar que pueden obstaculizar la unión de anticuerpos neutralizantes contra la Hemaglutinina (J. Zhao et al., 2014). El VDC es capaz de experimentar mutación, por lo que pocos cambios de aminoácidos en posiciones clave de los antígenos de la superficie del virus potencialmente dan como resultado cambios sustanciales en de la especificidad de la especie o en el tropismo (J. Zhao et al., 2014). Iniciar con la vigilancia de la infección por el VDC en especies silvestres y en los animales domésticos, ayuda a la identificación de nuevas variantes del VDC. Por este motivo, la caracterización molecular y antigénica de las cepas VDC es fundamental para conocer los mecanismos que están implicados en el fracaso de la vacuna CDV (J. Zhao et al., 2014).

## 6. CONCLUSIONES

Los resultados sugieren que las cepas circulantes en el norte de México están relacionadas con las cepas aisladas en Norte América formando un linaje soportado estadísticamente.

Las cepas silvestres son significativamente diferentes a las cepas del linaje América 1 o Vacunal y de otros linajes descritos previamente.

Es necesario continuar con los trabajos de investigación referente a las diferencias que existen de las cepas silvestres y las cepas de vacunas comercialmente disponibles. Se han realizado desde años pasados análisis filogenéticos en diferentes zonas geográficas que reflejan diferentes linajes correspondientes, pero no se han realizado cambios en las cepas vacúnales comercialmente disponibles.

En este trabajo, el análisis demostró que las cepas mexicanas forman un linaje nuevo, por esto es necesario ampliar la caracterización en otras ciudades y estados de México, así como aumentar la cantidad de muestra y aislar VDC en diferentes especies de fauna silvestre para conocer el comportamiento epizootiológico.

En conclusión no se tiene la seguridad de que los cambios genéticos observados en las cepas Mexicanas de VDC del presente estudio pueden ser responsables de los elevados índices de incidencia de Distemper canino en la población de caninos del área metropolitana de Monterrey, N.L., México. Sin embargo, acorde a lo encontrado es probable que la inclusión de cepas del linaje Norte América (grupo en el cuál se agruparon las secuencias usadas en el estudio) en las fórmulas de vacunas podría proveer un mayor espectro de protección contra las cepas silvestres que circulan en esta región.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- An, D. J., Yoon, S. H., Park, J. Y., No, I. S., & Park, B. K. (2008). Phylogenetic characterization of canine distemper virus isolates from naturally infected dogs and a marten in Korea. *Vet Microbiol*, 132(3-4), 389-395.
- Bolt, G., Jensen, T. D., Gottschalck, E., Arctander, P., Appel, M. J., Buckland, R., & Blixenkron-Moller, M. (1997). Genetic diversity of the attachment (H) protein gene of current field isolates of canine distemper virus. *J Gen Virol*, 78 ( Pt 2), 367-372.
- Calderon, M. G., 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(3-4), 341-349.
- Céspedes P., C. P., Navarro C. (2010). Modulación de la respuesta inmune durante la infección por virus distemper canino implicancias terapéuticas y en el desarrollo de vacunas *Arch Med Vet*, 42, 15-28.
- Eguiarte, L. E. (2007). Ecología Molecular. *Capítulo 1 La selección natural a nivel molecular, Instituto Nacional de Ecología*, 11-43.
- Elia, G., Belloli, C., Cirone, F., Lucente, M. S., Caruso, M., Martella, V., . . . Ormas, P. (2008). In vitro efficacy of ribavirin against canine distemper virus. *Antiviral Res*, 77(2), 108-113.
- Espinal, M. A., Diaz, F. J., & Ruiz-Saenz, J. (2014). Phylogenetic evidence of a new canine distemper virus lineage among domestic dogs in Colombia, South America. *Vet Microbiol*, 172(1-2), 168-176.

- Espinal Restrepo María Adelaida. (2013). Phylogenetic analysis of wild-type canine Distemper viruses circulating among dogs from the Aburrá Valley, Colombia. *Tesis Maestría en Ciencias Animales, Universidad de Antioquia, Facultad de Ciencias Agrarias, Colombia, 75.*
- Fischer, C. D., Ikuta, N., Canal, C. W., Makiejczuk, A., Allgayer Mda, C., Cardoso, C. H., . . . Lunge, V. R. (2013). Detection and differentiation of field and vaccine strains of canine distemper virus using reverse transcription followed by nested real time PCR (RT-nqPCR) and RFLP analysis. *J Virol Methods, 194(1-2)*, 39-45.
- Gamiz, C., Martella, V., Ulloa, R., Fajardo, R., Quijano-Hernandez, I., & Martinez, S. (2011). Identification of a new genotype of canine distemper virus circulating in America. *Vet Res Commun, 35(6)*, 381-390.
- Guo, L., Yang, S. L., Wang, C. D., Hou, R., Chen, S. J., Yang, X. N., . . . Yan, Q. G. (2013). Phylogenetic analysis of the haemagglutinin gene of canine distemper virus strains detected from giant panda and raccoon dogs in China. *Virol J, 10*, 109.
- Haas, L., Martens, W., Greiser-Wilke, I., Mamaev, L., Butina, T., Maack, D., & Barrett, T. (1997). Analysis of the haemagglutinin gene of current wild-type canine distemper virus isolates from Germany. *Virus Res, 48(2)*, 165-171.
- Han, G. Z., Liu, X. P., & Li, S. S. (2008). Cross-species recombination in the haemagglutinin gene of canine distemper virus. *Virus Res, 136(1-2)*, 198-201.
- Harder, T. C., Kenter, M., Appel, M. J., Roelke-Parker, M. E., Barrett, T., & Osterhaus, A. D. (1995). Phylogenetic evidence of canine distemper virus in Serengeti's lions. *Vaccine, 13(6)*, 521-523.

- Harder, T. C., Kenter, M., Vos, H., Siebelink, K., Huisman, W., van Amerongen, G., . . . Osterhaus, A. D. (1996). Canine distemper virus from diseased large felids: biological properties and phylogenetic relationships. *J Gen Virol*, 77 ( Pt 3), 397-405.
- Hashimoto, M., Une, Y., & Mochizuki, M. (2001). Hemagglutinin genotype profiles of canine distemper virus from domestic dogs in Japan. *Arch Virol*, 146(1), 149-155.
- Hirama, K., Goto, Y., Uema, M., Endo, Y., Miura, R., & Kai, C. (2004). Phylogenetic analysis of the hemagglutinin (H) gene of canine distemper viruses isolated from wild masked palm civets (*Paguma larvata*). *J Vet Med Sci*, 66(12), 1575-1578.
- Iwatsuki, K., Miyashita, N., Yoshida, E., Gemma, T., Shin, Y. S., Mori, T., . . . Mikami, T. (1997). Molecular and phylogenetic analyses of the haemagglutinin (H) proteins of field isolates of canine distemper virus from naturally infected dogs. *J Gen Virol*, 78 ( Pt 2), 373-380.
- Keller, S. M., Gabriel, M., Terio, K. A., Dubovi, E. J., VanWormer, E., Sweitzer, R., . . . Munson, L. (2012). Canine distemper in an isolated population of fishers (*Martes pennanti*) from California. *J Wildl Dis*, 48(4), 1035-1041.
- Knipe DM, M. H. F. V. B. (2007). Fields Virology. Book. 1:1450. König, M. (2004). Nachweis eines Genomabschnittes des Hundestaupavirus (CDV) mit der reversen Transkription/Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR). *Gienssen Deutschland*.
- Lamb, R. A., Parks G.D. (2007). Paramyxoviridae: The viruses and Their replication en Fields Virology, Lippincott Williams & Wilkins 5<sup>a</sup> Ed.

- Lan, N. T., Yamaguchi, R., Furuya, Y., Inomata, A., Ngamkala, S., Naganobu, K., . . . Tateyama, S. (2005). Pathogenesis and phylogenetic analyses of canine distemper virus strain 007Lm, a new isolate in dogs. *Vet Microbiol*, *110*(3-4), 197-207.
- Lan, N. T., Yamaguchi, R., Inomata, A., Furuya, Y., Uchida, K., Sugano, S., & Tateyama, S. (2006). Comparative analyses of canine distemper viral isolates from clinical cases of canine distemper in vaccinated dogs. *Vet Microbiol*, *115*(1-3), 32-42.
- Li, W., Li, T., Liu, Y., Gao, Y., Yang, S., Feng, N., . . . Xia, X. (2014). Genetic characterization of an isolate of canine distemper virus from a Tibetan Mastiff in China. *Virus Genes*, *49*(1), 45-57.
- Martella, V., Cirone, F., Elia, G., Lorusso, E., Decaro, N., Campolo, M., . . . Buonavoglia, C. (2006). Heterogeneity within the hemagglutinin genes of canine distemper virus (CDV) strains detected in Italy. *Vet Microbiol*, *116*(4), 301-309.
- Martella, V., Elia, G., & Buonavoglia, C. (2008). Canine distemper virus. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*, *38*(4), 787-797.
- Meli, M. L., Simmler, P., Cattori, V., Martinez, F., Vargas, A., Palomares, F., . . . Lutz, H. (2010). Importance of canine distemper virus (CDV) infection in free-ranging Iberian lynxes (*Lynx pardinus*). *Vet Microbiol*, *146*(1-2), 132-137.
- Mochizuki, M., Hashimoto, M., Hagiwara, S., Yoshida, Y., & Ishiguro, S. (1999). Genotypes of canine distemper virus determined by analysis of the hemagglutinin genes of recent isolates from dogs in Japan. *J Clin Microbiol*, *37*(9), 2936-2942.
- Negrao, F. J., Gardinali, N. R., Headley, S. A., Alfieri, A. A., Fernandez, M. A., & Alfieri, A. F. (2013). Phylogenetic analyses of the hemagglutinin gene of wild-type strains of canine distemper virus in southern Brazil. *Genet Mol Res*, *12*(3), 2549-2555.

- Orvell, C., Blixenkroner-Møller, M., Svansson, V., & Have, P. (1990). Immunological relationships between phocid and canine distemper virus studied with monoclonal antibodies. *J Gen Virol*, 71 ( Pt 9), 2085-2092.
- Ozkul, A., Sancak, A. A., Gungor, E., & Burgu, I. (2004). Determination and phylogenetic analysis of canine distemper virus in dogs with nervous symptoms in Turkey. *Acta Vet Hung*, 52(1), 125-132.
- Panzer, Y., Calderon, M. G., Sarute, N., Guasco, S., Cardeillac, A., Bonilla, B., . . . Perez, R. (2012). Evidence of two co-circulating genetic lineages of canine distemper virus in South America. *Virus Res*, 163(1), 401-404.
- Pardo, I. D., Johnson, G. C., & Kleiboeker, S. B. (2005). Phylogenetic characterization of canine distemper viruses detected in naturally infected dogs in North America. *J Clin Microbiol*, 43(10), 5009-5017.
- Pinotti M., G. A., Delgado A., Passegi C., Occhi H., Blainq L., Canevesio M. (2009). Distemper canino. *Ciencias Veterinarias*, 8, 29-45.
- Pinotti Mario. (2011). Distemper canino: Evaluación de dos alternativas terapéuticas y caracterización de aspectos clinico-epidemiológicos en la ciudad de Santa Fe durante los años 1999-2009. *Tesis Magister en Ciencias Veterinarias, Universidad nacional del Litoral, Facultad de Ciencias Veterinarias, Argentina* 114.
- Ronquist, F., Teslenko, M., van der Mark, P., Ayres, D. L., Darling, A., Höhna, S., Larget, B., Liu, L., Suchard, M. A., and Huelsenbeck, J. P. (2012). MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Syst Biol* 61(3), 539-42.
- Sarute, N. (2012). Detección del virus Distemper canino por RT-PCR en tiempo real y caracterización genética de aislamientos del Río de la Plata mediante el análisis de

- los genes de la Hemaglutinina y la proteína de fusión. *Tesis Maestría Universidad de la República, Facultad de Ciencias PREDECIBA , Uruguay*, 93.
- Sarute, N., Perez, R., Aldaz, J., Alfieri, A. A., Alfieri, A. F., Name, D., . . . Panzera, Y. (2014). Molecular typing of canine distemper virus strains reveals the presence of a new genetic variant in South America. *Virus Genes*, 48(3), 474-478.
- Sawatsky, B., & von Messling, V. (2010). Canine distemper viruses expressing a hemagglutinin without N-glycans lose virulence but retain immunosuppression. *J Virol*, 84(6), 2753-2761.
- Simon-Martinez, J., Ulloa-Arvizu, R., Soriano, V. E., & Fajardo, R. (2008). Identification of a genetic variant of canine distemper virus from clinical cases in two vaccinated dogs in Mexico. *Vet J*, 175(3), 423-426.
- Singethan, K., Topfstedt, E., Schubert, S., Duprex, W. P., Rima, B. K., & Schneider-Schaulies, J. (2006). CD9-dependent regulation of Canine distemper virus-induced cell-cell fusion segregates with the extracellular domain of the haemagglutinin. *J Gen Virol*, 87(Pt 6), 1635-1642.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., and Kumar, S. (2011). MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol* 28(10), 2731-9.
- Timothy Y. Woma, M. v. V., Ana-Mari Bosman, Melvyn Quan, Marinda Oosthuizen (2010). Phylogenetic analysis of the haemagglutinin gene of current wild-type canine distemper viruses from South Africa: Lineage Africa *Veterinary Microbiology*, 143, 126-132.

- Uema, M., Ohashi, K., Wakasa, C., & Kai, C. (2005). Phylogenetic and restriction fragment length polymorphism analyses of hemagglutinin (H) protein of canine distemper virus isolates from domestic dogs in Japan. *Virus Res*, *109*(1), 59-63.
- Visser, I. K., van der Heijden, R. W., van de Bildt, M. W., Kenter, M. J., Orvell, C., & Osterhaus, A. D. (1993). Fusion protein gene nucleotide sequence similarities, shared antigenic sites and phylogenetic analysis suggest that phocid distemper virus type 2 and canine distemper virus belong to the same virus entity. *J Gen Virol*, *74* ( Pt 9), 1989-1994.
- von Messling, V., & Cattaneo, R. (2002). Amino-terminal precursor sequence modulates canine distemper virus fusion protein function. *J Virol*, *76*(9), 4172-4180.
- von Messling, V., Milosevic, D., Devaux, P., & Cattaneo, R. (2004). Canine distemper virus and measles virus fusion glycoprotein trimers: partial membrane-proximal ectodomain cleavage enhances function. *J Virol*, *78*(15), 7894-7903.
- von Messling, V., Zimmer, G., Herrler, G., Haas, L., & Cattaneo, R. (2001). The hemagglutinin of canine distemper virus determines tropism and cytopathogenicity. *J Virol*, *75*(14), 6418-6427.
- Woma, T. Y., van Vuuren, M., Bosman, A. M., Quan, M., & Oosthuizen, M. (2010). Phylogenetic analysis of the haemagglutinin gene of current wild-type canine distemper viruses from South Africa: lineage Africa. *Vet Microbiol*, *143*(2-4), 126-132.
- Yi, L., Cheng, S., Xu, H., Wang, J., Cheng, Y., Yang, S., & Luo, B. (2012). Development of a combined canine distemper virus specific RT-PCR protocol for the differentiation of infected and vaccinated animals (DIVA) and genetic

characterization of the hemagglutinin gene of seven Chinese strains demonstrated in dogs. *J Virol Methods*, 179(1), 281-287.

Yi, L., Xu, H., Wang, J., Cheng, Y., Zhang, H., Yan, X., & Cheng, S. (2013). Complete Nucleotide Sequence of Canine Distemper Virus CDV-PS, Isolated from Dogs in China. *Genome Announc*, 1(3).

Zhao, J., Zhang, H., Bai, X., Martella, V., Hu, B., Sun, Y., . . . Yan, X. (2014). Emergence of canine distemper virus strains with two amino acid substitutions in the haemagglutinin protein, detected from vaccinated carnivores in North-Eastern China in 2012-2013. *Vet J*, 200(1), 191-194.

Zhao, J. J., Yan, X. J., Chai, X. L., Martella, V., Luo, G. L., Zhang, H. L., . . . Cheng, S. P. (2010). Phylogenetic analysis of the haemagglutinin gene of canine distemper virus strains detected from breeding foxes, raccoon dogs and minks in China. *Vet Microbiol*, 140(1-2),