Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California

Maestría en Ciencias en Nanociencias

Genotipificación del virus del moquillo canino aislado de perros enfermos y su relación con la eficacia del tratamiento antiviral con nanopartículas de plata.

Tesis
para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de
Maestro en Ciencias

Presenta:

César Augusto García Aguirre

Ensenada, Baja California, México
2018

Tesis defendida por

César Augusto García Aguirre

y aprobada por el siguiente Comité

Firma

Dra Karla Oyuky Juárez Moreno
Director de tesis

Miembros del comité

Dr. Alejandro Huerta Saquero

Dra. Elizabeth Ponce Rivas

Dra. María Evarista Arellano García

Dr. Sergio Fuentes Moyado
Coordinador del Posgrado en Nanociencias

Dra. Rufina Hernández Martínez
Directora de Estudios de Posgrado

Cesar Augusto García Aguirre© 2018
Queda prohibida la reproducción parcial o total de esta obra sin el permiso formal y explícito del autor y director de la tesis.

Resumen de la tesis que presenta **César Augusto García Aguirre** como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Nanociencias con orientación en Bionanotecnología.

Genotipificación del virus del moquillo canino aislado de perros enfermos y su relación con la eficacia del tratamiento antiviral con nanopartículas de plata.

Resumen aprobado por:

_____
Dra. Karla Oyuky Juárez Moreno
Director de tesis

El virus de moquillo canino causa una enfermedad de distribución mundial siendo la más difundida, contagiosa y letal en cánidos. Las nanopartículas de plata (AgNPs) poseen actividad antiviral contra un amplio espectro de virus, disminuyendo su infectividad *in vitro*, lo cual se ha sugerido que se debe a una interacción directa entre las AgNPs y las proteínas de la superficie viral. En este trabajo, se colectaron muestras biológicas de pacientes con signología sugestiva de moquillo para aislar ARN, diagnosticar y genotipificar mediante RT-PCR el virus del moquillo canino. El diagnóstico se realizó amplificando el gen *n* y la genotipificación mediante los genes *f* y *h* del virus, los amplicones obtenidos, se secuenciaron y se compararon con la cepa vacunal *Onderstepoort*. Los resultados permitieron diagnosticar a 12 de pacientes, de los cuales 8 fueron tratados por via oral con AgNPs. Se demostró que existen dos genotipos circulantes en la ciudad de Ensenada, Baja California: América 3 y "tipo-Rockborn". De los pacientes diagnositicados y tratados con AgNPs, 6 de ellos pertenecieron al genotipo América 3 y solamente 1 paciente al genotipo "tipo-Rockborn", el cual fue el único que sobrevivió a la infección viral. Las secuencias de los fragmentos de los genes *f* y *h* de los genotipos aislados, presentaron diferencias significativas respecto de la cepa vacunal, los cambios más importantes consisten en que el genotipo América 3 cuenta con un mayor número de N-glicosilaciones y cisteínas en la proteína F, lo cual le brinda una mayor estabilidad. Por el contrario, la proteína F del genotipo "tipo-Rockborn", presenta una menor cantidad de N-glicosilaciones y un menor número de cisteínas, por lo que puede ser susceptible a la desnaturalización por la unión de las AgNPs. Esta puede ser la razón del efecto antiviral eficaz de las AgNPs, ya que los pacientes en los que se aisló el genotipo America 3, no sobrevieron a la infección aún después de haber sido tratados con AgNPs. Sin embargo, el paciente infectado con el virus de moquillo "tipo-Rockborn" sobrevivió sin secuelas asociadas a la infección viral. Por lo tanto, una de las mayores contribuciones de este estudio fue el determinar que la eficacia del tratamiento antiviral con AgNPs puede relacionarse con el genotipo del virus con el que se infecte el paciente.

Palabras clave: **moquillo canino; AgNPs; RT-PCR; genotipificación; N-glicosilación**

Abstract of the thesis presented **by César Augusto García Aguirre** as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Nanoscience with orientation in Bionanotechnology.

Genotyping of canine distemper virus isolated from sick dogs and its relationship to the efficacy of antiviral treatment with silver nanoparticles.

Abstract approved by:

_____
Dra. Karla Oyuky Juárez Moreno
Thesis Director

Canine distemper virus causes a disease of worldwide distribution being the most widespread, contagious and lethal in canids. Silver nanoparticles (AgNPs) exhibited an effective antiviral activity against a broad spectrum of viruses, thus decreasing their infectivity *in vitro*, which has been suggested to be due to a direct interaction between AgNPs and viral surface proteins. In this work, biological samples were collected from patients with suggestive signs of distemper to isolate RNA, diagnose and genotype the canine distemper virus by RT-PCR. The diagnosis was achieved by amplifying the *n* gene while genotyping was made using the F and H genes of the virus. The obtained amplicons were sequenced and compared with the vaccine strain *Onderstepoort*. The results of this work allowed the diagnosis of 12 patients, of which 8 were treated with AgNPs. It was shown that there are two different circulating genotypes in the city of Ensenada, Baja California: América 3 and Rockborn-like. From all the patients treated with AgNPs, 6 of them belonged to the America 3 genotype and only 1 patient to Rockborn-like genotype, this was the only patient who survived the viral infection. In comparison to the vaccine strain, the sequences of gene fragments *f* and *h* isolated from patient showed significant differences. Some of the most important changes were that the America 3 genotype has a greater number of N-glycosylations and cysteines in the F protein providing a greater stability. In contrast, the F protein of Rockborn-like genotype has a smaller amount of N-glycosylations, as well as a lower number of cysteines, beging more susceptible to its denaturation by the AgNPs binding. This may be one of the reasons for the effective antiviral effect of AgNPs since the patients in whom genotype America 3 was isolated, did not survive the infection with the virus even after being treated with AgNPs. However, the patient infected with the Rockborn-type virus survived without any sequelae associated with the viral infection. Therefore, one of the major contributions of this study was to determine that the efficacy of treatment with AgNPs could be related to the genotype of the virus with which the patient is infected.

Keywords**: canine distemper; AgNPs; RT-PCR; genotype; N-glycosylation.**

Dedicatoria

A mi hermano
Te extraño

Agradecimientos

A mis colegas, muchos de ellos amigos, que me brindaron su confianza para creer en este proyecto y así facilitarme muestras de sus pacientes, asimismo a los propietarios de estos pacientes que también confiaron en el proyecto, aceptando que se les tomaran las muestras y a administrar el tratamiento a sus mascotas y por lo tanto a todos los caninos que participaron en el estudio, aunque ellos no tomaron la decisión, pero si pudieran decirnos la mayoría hubiera aceptado, contribuyendo para ayudar a más de ellos.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el cual recibí el apoyo económico para poder llevar a cabo mis estudios de maestría y al proyecto CONACYT No. 269071.

A las instituciones que me brindaron los conocimientos necesarios e instalaciones para poder realizar la maestría, a su personal académico y administrativo del Centro de Investigación Científica y Educación Superior de Ensenada (CICESE) y del Centro de Nanociencias y Nanotecnología (CNyN) de la UNAM.

A mi directora de tesis, la Dra. Karla Oyuky Juárez, por el apoyo recibido desde antes de entrar al posgrado y ya dentro de el, por toda su paciencia, confianza y conocimientos que ayudaron a mi formación.

A los miembros del comité de tesis, el Dr. Alejandro Huerta, la Dra. Elizabeth Ponce y la Dra. Evarista Arellano, por su apoyo, sus valiosas observaciones y correcciones a lo largo de este trabajo.

Al Departamento de Bionanotecnología por facilitarnos el uso de su infraestructura y a la Dra. Katrin Quester por la ayuda técnica en el mantenimiento de los equipos e insumos.

A la Red Internacional de Bionanotecnología con impacto en biomedicina, alimentación y bioseguridad del CONACYT por todo su apoyo y aportaciones.

A todos mis amigos y compañeros del laboratorio de Bionano y de la maestría, que gracias a su ayuda y compañía todo fue más ameno.

A mis amigos y familia, que muchos de ellos a pesar de que están lejos siempre están.

Y por supuesto a Chencho, mi perro, por ser el control negativo de este estudio y por su inigualable compañía.

Tabla de contenido

Página

Resumen en español..... ii
Resumen en inglés..... iii
Dedicatorias..... iv
Agradecimientos..... v
Lista de figuras..... viii
Lista de tablas..... x

Capítulo 1. Introducción..... 1

Capítulo 2. Antecedentes..... 4
2.1 Virus del moquillo canino..... 4
2.1.1 Clasificación Taxonómica y estructural viral..... 4
2.1.2 Genomal viral..... 6
2.1.3 Proteínas virales del virus del moquillo canino..... 6
2.1.3.1 Proteína de nucleocápside (N)..... 6
2.1.3.2 Proteínas codificadas por el gen P/V/C: fosfoproteína y proteínas V y C..... 7
2.1.3.3 Proteína de matriz (M)..... 7
2.1.3.4 Proteína de fusión (F)..... 7
2.1.3.5 Proteína hemaglutinina (H)..... 8
2.1.3.6 Proteína *large* (L)..... 9
2.1.4 Ciclo replicativo del virus del moquillo canino..... 9
2.2 La enfermedad del moquillo canino..... 11
2.2.1 Patogénesis..... 11
2.2.2 Presentaciones clínicas..... 15
2.2.3 Epidemiología..... 15
2.2.4 Prevención y control del virus del moquillo canino..... 16
2.2.5 Diagnóstico de la infección por el virus del moquillo canino..... 17
2.2.5.1 RT-PCR punto final..... 17
2.2.6 Caracterización genética del virus del moquillo canino..... 18
2.2.6.1 El gen de la hemaglutinina como herrramienta para la genotipificación del virus del moquillo canino..... 18
2.2.6.2 Péptido señal de la proteína de Fusión..... 20
2.2.7 Tratamiento del virus del moquillo y nuevas alternativas..... 20
2.3 Actividad antiviral de las AgNPs..... 23
2.3.1 Evaluaciones toxicológicas..... 27
2.3.2 Evaluación *in vivo* de AgNPs..... 28

Capítulo 3. Justificación, Hipótesis y Objetivos 30

3.1 Justificación 30
3.2 Hipótesis 30
3.3 Objetivos 31
3.3.1 Objetivo general 31
3.3.2 Objetivos específicos 31

Capítulo 4. Metología 32

4.1 Recolección de la historia clínica y muestras de pacientes 32
4.1.1 Recolección de muestras 33
4.2 Aislamiento del ARN viral 33
4.2.1 Protocolo TRI Reagent BD para la extracción de ARN viral de muestras de sangre, suero, plasma y vacuna 34
4.2.2 Protocolo minikit de ARN/ADN viral PureLink para las muestras de orina, secreción óculo-nasal y líquido cefalorraquídeo 34
4.3 Reacción de transcripción inversa 35
4.4 Amplificación por PCR de punto final 36
4.5 Electroforesis en gel de agarosa 39
4.6 Visualización de los fragmentos de PCR 39
4.7 Purificación de los fragmentos de PCR (amplicones) 40
4.8 Secuenciación de ADN 40
4.9 Análisis de las secuencias 40
4.10 Tratamiento antiviral de AgNPs 41

Capitulo 5. Resultados 43

5.1 Recolección de la historia clínica y muestras de pacientes 43
5.2 Oligonucleótidos selecionados para la reacción de PCR 44
5.3 Amplificación por PCR de punto final 50
5.4 Pacientes que recibieron tratamiento antiviral de AgNPs y pacientes que resultaron positivos para el PCR de los genes *n* (diagnóstico), *f* y *h* (genotipificación) 53
5.5 Análisis bioinformático 55
5.6 Relación del genotipo viral y la eficiencia del tratamiento antiviral con AgNPs 57

Capítulo 6. Discusión 59

6.1 Diagnóstico del moquillo canino 59
6.2 Genotipos del virus del moquillo canino 61
6.3 Relación del genotipo viral del moquillo canino y la eficacia del tratamiento con AgNPs 62

Capítulo 7. Conclusiones 65

Literatural citada 67

Anexos 78

Lista de figuras

Figura		Página
1	Morfología del virón del virus del moquillo canino y organización del genoma.....	5
2	Esquema del arreglo del gen *f*.....	8
3	Representación del mecanismo de fusion virus-célula mediado por la hemaglutinina y la proteína de fusion.....	9
4	Representación del ciclo de replicación de un *Paramixovirus* en la célula del hospedero.....	11
5	Esquema de la patogénesis del moquillo canino.....	14
6	Micrografía de VIH-1 expuesto a AgNPs.....	25
7	Modelo esquemático de un virus que infecta una célula eucariótica y mecanismo antiviral de nanopartículas metálicas.....	26
8	Algunas de las características fisicoquímicas de los AgNPs Argovit™.....	42
9	Esquema del gen *n* de la cepa *Onderstepoort* del virus del moquillo canino, el sitio donde se une cada par de oligonucleótido y el tamaño de amplicón que producen.....	46
10	Productos de la reacción de PCR obtenidos con el control positivo (*Onderstepoort)* y los diferentes pares de oligonucleótidos para el gen *n*.....	46
11	Esquema de los genes *f* y *h* de la cepa *Onderstepoort* del virus del moquillo canino, el sitio donde se une cada par de oligonucleótido y el tamaño de amplicón que producen.....	48
12	Productos de PCR del control positivo y los diferentes pares de oligonucleótidos para genotipificación del gen *h*.....	49
13	Amplicón resultante de la combinación de los oligonucleótidos Chi1H forward con EUA1H reverse que hibridan en el gen *h* del virus del moquillo.....	49
14	Diagrama de los genes *f* y *h*, en donde se hibridan los oligonucleótidos de Arg1F y la combinación de Ch1H fw con EUA1H rv y el tamaño del fragmento obtenido.....	50
15	Productos de PCR de pacientes positivos a moquillo canino con el par de oligonucleótidos de Mex3N (Pacientes A-H).....	51
16	Productos de PCR de pacientes positivos a moquillo canino con el par de oligonucleótidos de Mex3N (Pacientes H-L).....	51
17	Productos de PCR para genotipificación del virus del moquillo canino con el par de oligonucleótidos de Arg1F (Pacientes A-D).....	52

18	Productos de PCR para genotipificación del virus del moquillo canino con el par de oligonucleótidos de Arg1F (Pacientes E-H)…….....	52
19	Productos de PCR para genotipificación del virus del moquillo canino con el par de oligonucleótidos de Chi1Hf-EUA1Hr (Pacientes A-D)……	53
20	Productos de PCR para genotipificación del virus del moquillo canino con el par de oligonucleótidos de Chi1Hf-EUA1Hr (Pacientes E-H)……	53
21	Productos de PCR para genotipificación del virus del moquillo canino con el par de oligonucleótidos de Arg1F (Pacientes que no amplificaron)……	81
22	Productos de PCR para genotipificación del virus del moquillo canino con el par de oligonucleótidos de Chi1Hf-EUA1Hr (Pacientes que no amplificaron)……	81

Lista de tablas

Tabla		Página
1	Concentraciones efectivas inhibitorias de AgNPs en sistemas biológicos.	23
2	Efecto antiviral de las nanopartículas de plata	25
3	Tipo de muestra para análisis molecular dependiendo de la fase del moquillo canino	32
4	Oligonucleótidos utilizados para la amplificación de los segmentos de los genes *n, f* y *h* del virus del moquillo canino	36
5	Características fisicoquímicas de los AgNPs Argovit™	41
6	Datos de la historia clínica y el tipo de muestra de los pacientes	43
7	Oligonucleótidos utilizados para la detección del virus del moquillo canino y el tamaño del producto de PCR resultante utilizando como control positivo la cepa *Onderstepoort*	45
8	Oligonucleótidos utilizados para la genotipificación del virus del moquillo canino y el tamaño del producto de PCR resultante utilizando como control positivo la cepa Onderstepoort	47
9	Letra asignada a cada paciente en los PCR de diagnóstico y genotipificación	51
10	Resultados de los PCR de diagnóstico, genotipificación y sobrevivencia de los pacientes que recibieron o no tratamiento con AgNPs	54
11	Cambios nucleotídicos y aminoacídicos en el gen *n* de las secuencias de los 8 pacientes	55
12	Cambios nucleotídicos y aminoacídicos en el gen *f* de las secuencias de los 8 pacientes	56
13	Cambios nucleotídicos y aminoacídicos en el gen *h* de las secuencias de los 8 pacientes	57
14	Relación de los pacientes genotipificados que recibieron el tratamiento de AgNPs y la supervivencia	58

Con formato: Justificado

Capítulo 1. Introducción

El virus de moquillo canino causa una enfermedad multisistémica, conocida como "moquillo", la cual es de distribución mundial siendo la más difundida, contagiosa y letal que se presenta en los cánidos (Pardo *et al.,* 2005). Es un virus envuelto muy sensible al medio ambiente, pero con una alta infectividad, debido que a partir del séptimo día postinfección es excretado a través de todo tipo de secreciones, exudados y fluidos corporales. Esto hace que se disemine rápidamente en el ecosistema gracias a la existencia de animales infectados que eliminan el virus antes de manifestar signos asociados a la virosis (Summers y Appel, 1994).

Mundialmente se reconoce un solo serotipo. No obstante, circulan varios genotipos de distinta virulencia y tropismo celular (Lamb and Kolakofsky, 2001). Algunas cepas están asociadas con polioencefalitis, mientras que otras inducen leucoencefalitis desmielinizante. Dependiendo de la cepa viral, los signos pueden relacionarse con enfermedad aguda de la sustancia gris o con enfermedad subaguda o crónica de la sustancia blanca (Krakowka and Koestner, 1997; Orlando *et al*., 2008).

La enfermedad es de curso muy variable y tiene varias formas de presentarse, pero se caracteriza por los siguientes signos: elevación de la temperatura, anorexia, enrojecimiento de la mucosa nasal y conjuntival, diarrea, descarga serosa nasal y ocular, tonsilitis, y también se presenta frecuentemente con signos respiratorios y neurológicos (Beineke *et al.,* 2009; Beineke *et al.,* 2015). No se presentan todos los signos clínicos, o al menos no lo hacen de una forma estrictamente ordenada, ya que esto depende de varios factores como la cepa viral y el estatus inmunológico del animal afectado (Beineke *et al.,* 2015).

El diagnóstico de la enfermedad es muchas veces un reto, debido a que en algunos casos los animales pueden no presentar signos sistémicos que son comunes de la enfermedad. Los exámenes serológicos no garantizan el diagnóstico de la enfermedad debido a que son poco precisos e inespecíficos debido a que un título elevado de anticuerpos puede ser resultado ya sea por una vacunación previa, por enfermedad subclínica anterior o en curso, o por infección clínica. Por otro lado, cuando el moquillo es severo, el título de anticuerpos puede ser bajo debido a la inmunosupresión causada por el virus (Cha *et al.,* 2012; Prager *et al.,* 2012). En contraste, el uso de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) como prueba diagnóstica para el diagnóstico de moquillo canino hace que el resultado sea más preciso y específico, debido a que puede identificar la presencia del virus por medio del hallazgo de la información genética de este en las células infectadas (Rzezutka y Mizak, 2002; Amude *et al.,* 2015).

Al tratarse de una enfermedad viral que involucra diferentes órganos y sistemas, el tratamiento convencional es inespecífico y de sostén, debido a la carencia de tratamientos específicos con fármacos antivirales, por lo que deben adaptarse a cada caso particular. Básicamente deben controlarse las infecciones bacterianas secundarias, y tratar los signos clínicos observados (Greene and Appel, 2006). En los últimos años se han adoptado alternativas terapéuticas, que consisten en estimular la respuesta inmune innata empleando agentes inmunomoduladores y empleando fármacos que limiten la acción del virus afectando su replicación. Sin embargo, los resultados de dichas alternativas terapéuticas no han tenido el efecto deseado y es por esto que se están buscando nuevas áreas donde se puedan estudiar y desarrollar nuevos tratamientos para esta y más enfermedades. Una nueva tecnología que está innovando en el área médica y en muchas otras áreas es la Nanotecnología.

Actualmente, con el auge de la Nanotecnología se han sintetizado diversos nanomateriales, en particular nanopartículas (NPs) inorgánicas, que presentan un marcado efecto microbicida sobre una amplia variedad de microorganismos, tales como virus, bacterias y hongos (Isenberg *et al.,* 1999; Shah *et al.,* 2013). La capacidad microbicida de las NPs está vinculada a la naturaleza del material y a ciertas características intrínsecas de las mismas, como sus dimensiones nanómetricas y la alta relación área/volumen que permite un mayor contacto e interacción con dichos microorganismos (Shah *et al.,* 2013). Entre las NPs que han demostrado tener excelentes propiedades microbicidas están las metálicas como las de plata, óxido de zinc, cobre u óxidos de hierro (Isenberg *et al.,* 1999). Las NPs presentan mecanismos de acción microbicida totalmente diferentes a los antibióticos tradicionales, proporcionando así una alternativa promisoria (Entenza *et al.,* 1997; Shah *et al.,* 2013).

El tamaño pequeño, la solubilidad mejorada y la multifuncionalidad de las NPs, abren nuevas líneas de investigación para el área de las Ciencias Biológicas como la Bionanotecnología (McNeil, 2005), la cual es un área multidisciplinaria relativamente nueva que integra elementos de las ciencias biológicas, con las nanociencias y la nanotecnología (Vázquez, 2013).

Las investigaciones dirigidas a la búsqueda de otras alternativas para el tratamiento de las infecciones causadas por bacterias y virus resistentes se incrementan cada día. Dentro de la gama de compuestos cuya actividad bactericida y antiviral se está investigando, las nanopartículas de plata (AgNPs) surgen como un prometedor agente que podría ser utilizado para tales efectos. En diversos estudios se han reportado las propiedades antimicrobianas y antivirales de las AgNPs. Como ejemplo, en 2005 Elechiguerra y colaboradores reportaron la actividad antiviral de AgNPs. Este grupo demostró que, sin ser citotóxicas, las

AgNPs son capaces de inhibir la infección por VIH-1 en cultivos celulares *in vitro* actuando en la etapa de fusión del virus a la célula.

En un estudio donde el tratamiento con AgNPs fue enfocado en pacientes con moquillo canino, éstas proporcionaron una tasa de recuperación de más del 90% en pacientes que no presentaban signología nerviosa (Bogdanchikova *et al*., 2016). Sin embargo, en pacientes que presentaron signología nerviosa, la tasa de recuperación fue muy baja, los autores atribuyen estos resultados a la posible virulencia y tropismo de los distintos genotipos existente del virus del moquillo, pues existen casos donde se reporta una afección directa y más agresiva al sistema nervioso sin presentar otras signologías del sistema respiratorio o gastrointestinal. Por lo tanto, se cree que es muy importante conocer con que genotipo viral se están infectado los pacientes y determinar si existe una relación entre el efecto del tratamiento antiviral de AgNPs con el genotipo del virus del moquillo presente en el paciente.

Capítulo 2. Antecedentes

2.1 Virus del moquillo canino

El moquillo canino, también llamado *distemper* o enfermedad de Carré, se cree que se originó en España en el siglo XVIII. Sin embargo, se conocen registros de Charles Frederick Hensinger en el año 1853, que mencionan que el virus fue llevado desde Perú a España, durante ese mismo siglo (Panzera *et al.,* 2015; De Vries *et al.,* 2015). La enfermedad que produce dicho virus fue descrita por Edward Jenner en 1809 y su etiología viral demostrada por Carré en 1906. El virus afecta diversos órganos, incluyendo tejidos linfoides, tractos respiratorio e intestinal, piel y encéfalo, siendo sus manifestaciones patológicas más severas la inmunosupresión y una leucoencefalitis desmielinizante (Greene and Appel, 2006).

Este virus es muy susceptible al calor y la resequedad y se inactiva rápidamente por la luz ultravioleta, solventes orgánicos, acidez o alcalinidad extrema, a una temperatura de 37°C. Así mismo a temperatura ambiente se inactiva en muy pocas horas, pero resiste frente a diversos reactivos físicos y químicos (Fenner *et al*., 1992). Es susceptible al éter y cloroformo, solución de formaldehídos diluido (<0.5%), fenol (0.75%), desinfectantes de amoniaco cuaternario, entre otros, lo que nos muestra que los protocolos habituales de limpieza y desinfección de centros veterinarios o perreras son eficaces (Craig, 2000).

Además, el tiempo de supervivencia del virus del moquillo canino es mayor a temperaturas bajas, ya que entre 0-4°C el virus puede sobrevivir por semanas y por debajo de la congelación (-65°C) puede sobrevivir incluso más de 7 años (Greene y Appel, 1998). Debido a esto que por medio del proceso de la liofilización se reduce la labilidad del virus y puede ser preservado en vacunas comerciales y el uso en laboratorios (Craig, 2000).

2.1.1 Clasificación Taxonómica y estructura viral

El virus del moquillo canino pertenece al orden *Mononegavirales*, familia *Paramyxoviridae,* género *Morbillivirus*. Es un virus pleomórfico, normalmente esférico, relativamente grande con un diámetro aproximado entre 150-300 nm (Zipperle *et al.*, 2010) y contiene una cadena simple de ARN de sentido negativo, helicoidal y con envoltura lipoproteica (Swango, 1992), formado por aproximadamente 15,7 kb

(Lamb y Parks, 2007). El ARN genómico está empaquetado por la proteína de la nucleocápside (N) y es replicado por el complejo de la polimerasa viral formado por la proteína *Large* (L) y su cofactor, la fosfoproteína (P). Las proteínas N, P y L, junto al ARN viral forman el complejo ribonucleoproteico (RNP), el cual dirige la síntesis secuencial del ARN mensajero (ARNm) a partir de los genes virales, o bien la replicación de los antigenomas (ARNs virales de polaridad positiva). La envoltura lipídica contiene dos proteínas integrales de membrana, la proteína fusión (F) y la de hemaglutinina (H), y una proteína asociada a la membrana que interactúa con el complejo RNP, llamada proteína matriz (M), dicha estructura del virus se esquematiza en la **figura 1** (von Messling *et al*., 2001).

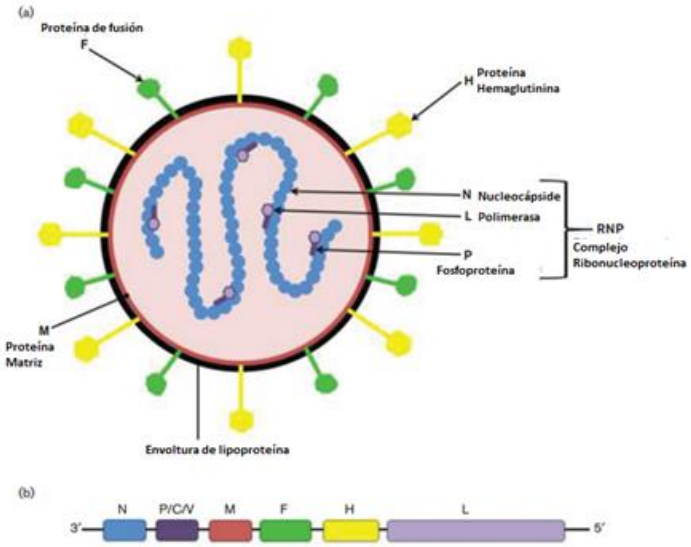


Figura 1. Morfología del virón del virus del moquillo canino y organización del genoma. a) Diagrama esquemático de una partícula del virus del moquillo canino en un corte transversal. b) Mapa del ARN genómico (3´- 5´) del virus del moquillo canino (Modificado de Loots *et al*, 2017).

2.1.2 Genoma viral

El genoma viral del virus del moquillo canino presenta seis genes llamados *n, p/v/c, m, f, h* y *l* que codifican las seis proteínas estructurales del virión. Cada gen codifica una única proteína, excepto el gen *p*/v/c que codifica la fosfoproteína P y dos proteínas no estructurales denominadas C y V.

En los extremos del ARN genómico existen regiones UTR (Untranslated region) no codificantes, denominadas leader 3´y trailer 5´, que son esenciales para la replicación y transcripción de los genes virales (Lamb y Parks, 2007). Entre genes adyacentes existe un triplete intergénico consenso (GAA) que no se transcribe y que separa a los sitios de poliadenilación de los sitios de inicio de la transcripción (Liermann *et al*., 1998).

Los genes son transcritos por el complejo RNP a partir de un promotor simple mediante un mecanismo de *start-stop*. Este mecanismo implica que la transcripción se inicia en el primer gen del extremo 3´ (gen *n*) y se detiene en cada región intergénica, debido a que la polimerasa viral se escinde del ARN molde, lo cual puede determinar la interrupción del proceso. Por lo tanto, este mecanismo conduce a un gradiente transcripcional que se mantiene durante la infección; de tal modo que los genes próximos al extremo 3´del genoma se transcriben más que aquellos cercanos al extremo 5´del genoma (Anderson y von Messling, 2008).

2.1.3 Proteínas virales del virus del moquillo canino

2.1.3.1 Proteína de nucleocápside (N)

La proteína de nucleocápside es codificada por el gen *n* y presenta 525 aminoácidos (aa). La nucleocápside es una proteína de unión al ARN que se autoensambla sobre el genoma viral y el ARN antisentido para formar, junto a las proteínas P y L, el complejo RNP (Lamb y Parks, 2007).

2.1.3.2 Proteínas codificadas por el gen P/V/C: fosfoproteína y proteínas V y C

La fosfoproteína P está constituida por 507 aa y es un cofactor de la polimerasa que se activa por fosforilación y forma parte activa del complejo RNP (Lamb y Parks, 2007).

Por otro lado, la proteína C es traducida a partir del mismo ARNm que P, pero presenta un codón de inicio alternativo situado 22 nucleótidos corriente abajo del codón iniciador de la proteína P. Esto produce un corrimiento en el marco abierto de lectura (ORF) generando un codón de terminación prematuro, lo cual determina que la proteína C tenga una extensión de 174 aa (Bellini, 1985).

Por otro lado, la proteína V consta de 299 aa y es traducida a partir del mismo codón de inicio que la proteína P, sin embargo, mediante un proceso de edición del ARN mensajero (ARNm) se añade una guanina (G), que determina un corrimiento en el marco de lectura y la formación de un codón de terminación prematuro. Ambas proteínas presentan la misma secuencia aminoacídica en los primeros 231 aa, pero los 68 aa del extremo carboxil-terminal de la proteína V difieren de los presentes en la proteína P (Cattaneo *et al*., 1989). Se ha sugerido que las proteínas accesorias V y C están involucradas en la evasión de la respuesta inmune mediada por el Interferón-β (Lamb y Parks, 2007).

2.1.3.3 Proteína de matriz (M)

La proteína de matriz es codificada por el gen *m* y está constituida por 335 aa. Esta proteína se posiciona debajo de la envoltura lipídica, e interactúa con el núcleo RNP, la bicapa lipídica y con las colas citoplasmáticas de las glicoproteínas de membrana H y F. Debido a las interacciones que establece, presenta un papel fundamental en la morfología y el ensamblaje del virión (Lamb y Parks 2007).

2.1.3.4 Proteína de fusión (F)

La proteína de fusión es una glicoproteína transmembranal de tipo I de 662 aa que participa en la fusión de la envoltura viral con la membrana plasmática de la célula hospedero (Lamb y Parks, 2007). La proteína F es codificada por el gen *f* bajo la forma de un precursor inactivo denominado pre-F0; el procesamiento

de la proteína implica el reconocimiento del péptido señal (Fsp) por una molécula específica y el subsecuente transporte hacia el retículo endoplásmico (RE), donde el precursor pre-F0 es procesado co-traduccionalmente (von Messling y Cattaneo, 2002). El procesamiento ocurre entre los aminoácidos 135-136 por la acción de una peptidasa celular (SPase), generando el péptido señalizador Fsp de 135 aa y al precursor inmaduro F0 de 527 aa. El precursor F0 es glicosilado y escindido por una furina celular que actúa en el compartimiento del Golgi, formando las subunidades F1 y F2 (**Figura 2**). Estas subunidades forman un heterodímero que constituye la forma activa de la proteína F (Plattet *et al*., 2007). A nivel de la envoltura, la proteína F, forma un trímero que interactúa con la hemaglutinina durante el proceso de fusión virus-célula (von Messling *et al*., 2004).

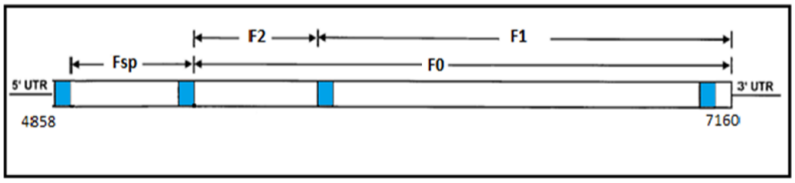


Figura 2. Esquema del arreglo del gen *f* con las regiones que codifican para las subunidades de la proteína F (Modificado de von Messling y Cattaneo, 2002).

2.1.3.5 Proteína hemaglutinina (H)

La hemaglutinina del virus del moquillo canino tiene 607 aa y es codificada por el gen *h*. Es una glicoproteína transmembranal de tipo II que media la unión de los viriones a los receptores celulares y posee la capacidad de promover la fusión virus-célula (Lamb y Parks 2007). La proteína H presenta un dominio citoplasmático corto en su extremo amino-terminal, un dominio hidrofóbico transmembranal con funciones de localización y anclaje a la membrana, y un ectodominio carboxilo-terminal (Zipperle *et al*., 2010). Dicha proteína forma un tetrámero a nivel de la envoltura que interactúa físicamente con la proteína F como se observa en la **figura 3** (von Messling *et al*., 2004).

Estudios *in vitro* mostraron que la proteína H es el determinante principal del tropismo celular (Stern *et al*., 1995). Es probable que el tropismo del virus del Moquillo canino y la fusión en células Vero, se mantenga fundamentalmente por acción de la proteína H (von Messling *et al*., 2001).

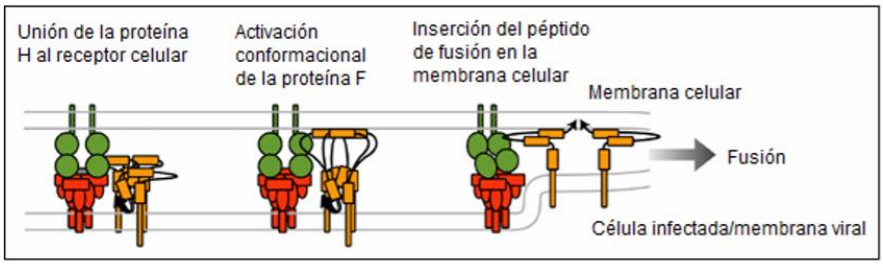


Figura 3. Representación del mecanismo de fusión virus-célula mediado por la hemaglutinina y la proteína de fusión (Modificado de Schneider-Schaulies y Ter Meulen., 2002).

2.1.3.6 Proteína *large* (L)

La proteína *large* es codificada por el gen *l*, consta de 2184 aa y es la subunidad fundamental del complejo de la ARN polimerasa por su rol catalítico en la síntesis del ARN viral (Lamb y Parks, 2017). La proteína L se asocia al ARN encapsidado a través de su interacción con la proteína P, quien actúa como enlace o adaptador, para formar el complejo de transcripción. La proteína L se encuentra en asociación con las proteínas N, P y el ARN genómico formando la nucleocápside. Cumple la función de ARN polimerasa dependiente de RNA (Sidhu *et al*., 1993).

2.1.4 Ciclo replicativo del virus del moquillo canino

La fusión de la envoltura lipídica viral con la membrana plasmática de la célula hospedero ocurre a pH neutro, permitiendo el ingreso del complejo RNP a la célula. La actividad de fusión se realiza mediante la acción concertada de las glicoproteínas de membrana H y F (Stern *et al*., 1995; von Meslling *et al*., 2001; Zipperle *et al*., 2010). El proceso de fusión comienza por la unión de la hemaglutinina al receptor SLAM (Signaling Lymphocyte Activation Molecule) presente en linfocitos B y T activados, timocitos inmaduros y células dendríticas. Luego de la unión, la proteína H induce cambios conformacionales en la proteína F que favorecen su actividad de fusion entre la membrana celular y la envoltura viral (Sawatsky y von Messling,

2010). Dicho proceso ocurre sobre la membrana celular del hospedero por la acción específica del péptido de fusión, localizado en la subunidad F1 de la proteína F del virus del moquillo (von Messling *et al*., 2004a).

Tras el ingreso del complejo RNP al citoplasma ocurre la transcripción del genoma viral. La síntesis del ARNm comienza en el extremo 3´del genoma y los genes son transcritos en mensajeros que codifican para las proteínas virales. Una vez ocurrida la transcripción, la polimerasa viral comienza la síntesis de los antigenomas que serán utilizados como molde para la producción de nuevos ARN genómicos. Los genomas virales neosintetizados son encapsidados y transportados hacia la membrana plasmática para formar nuevas partículas virales (Lamb y Parks, 2007).

El ARN genómico encapsidado por las proteínas N, P y L forma el complejo RNP, el cual se asocia con la proteína M localizada en la membrana plasmática, donde yacen las glicoproteínas H y F previamente exportadas. Las partículas virales neosintetizadas son liberadas mediante un proceso lisogénico de la membrana celular y posee la capacidad de infectar nuevas células susceptibles como se observa en la **figura 4** (Lamb y Parks, 2007).

Mediante la formación de las células multinucleadas (*sincitios*), el virus se propaga entre las células del hospedero. Los sincitios son el resultado de la fusión de células infectadas que expresan las glicoproteínas virales en su superficie, con células susceptibles que presentan el receptor SLAM (Stern *et al*., 1995). La proteína H es el determinante principal de la fusión. Por tanto, el grado y la eficiencia de la fusión célula-célula se debe principalmente a esta proteína (von Messling *et al*., 2001).

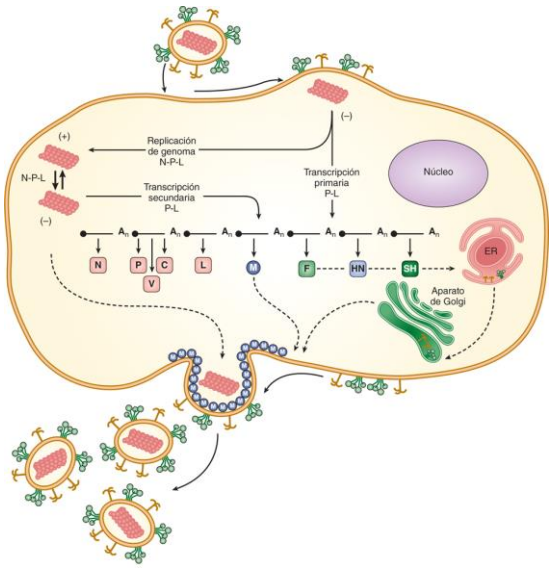


Figura 4. Representación del ciclo de replicación de un *Paramixovirus* (familia que incluye al virus del moquillo caninino) en la célula del hospedero (Brooks *et al.*, 2014).

2.2 La enfermedad del moquillo canino

2.2.1 Patogénesis

La naturaleza de la enfermedad es variable y su curso depende en gran medida de las interacciones entre el virus y el sistema inmune del hospedero. Si bien todos los perros son susceptibles a dicho virus, principalmente son afectados los cachorros de tres a seis meses de edad, ya que han perdido los anticuerpos maternales y su sistema inmune tiene una menor eficiencia (Martella et al., 2008, Summers y Appel, 1994). El período de incubación del virus es de 6 a 9 días, pero los signos se observan después de 2 a 3 semanas de haber estado expuestos al contagio. Los perros infectados pueden excretar el virus durante un máximo de 60 a 90 días post-infección (Johnson *et al*., 1995).

El virus del moquillo canino se transmite en forma directa por aerosoles o contacto con animales infectados, a partir de todo tipo de secreciones corporales (Fenner et al., 1992). A través del tracto respiratorio, oral y ocular, alcanza las superficies mucosas donde se da la infección temprana de linfocitos

locales y células mononucleares CD150^{+} (von Messling *et al*., 2004b, 2005). En este tipo de células, el virus despliega una serie de mecanismos neutralizantes para evadir la respuesta inmune innata y adaptativa como son: (a) utilización de células del sistema inmune como vehículos de transporte a los nódulos linfáticos regionales (ganglios bronquiales, retrofaríngeos y tonsilas), aumentando considerablemente en número de dos a cuatro días postinfección (PI) (Greene y Appel, 1998), (b) replicación deletérea en subpoblaciones de linfocitos entre el primer y tercer día PI, (c) establecimiento de la viremia primaria asociada a leucocitos, (d) intensa replicación en órganos linfoides con disminución selectiva de la subpoblación Th1 y (e) establecimiento del cuadro multisistémico al séptimo día PI (von Messling *et al*., 2004b).

El ingreso de este virus a los linfocitos depende de la unión de la hemaglutinina viral y del receptor linfocitario CD150/SLAM (von Messling *et al*., 2001, Tatsuo *et al*., 2001). Este receptor se encuentra ampliamente extendido en poblaciones linfocitarias activas lo que explica el gran linfotropismo y la importancia de la hemaglutinina en la virulencia y citopatogenicidad (von Messling *et al*., 2003, Vandevelde y Zurbriggen, 2005).

Luego de infectar células inmunes, el virus asegura la síntesis del antigenoma (ARNm) y la replicación, formando un complejo ribonucleoproteico y evitando así el reconocimiento del TollLike Receptor-3 (TLR-3) e inhibiéndo las vías de activación del factor de transcripción Nuclear Factor-Kappa B (NF-κB) responsable de activar la expresión de citocinas proinflamatorias, quimiocinas, moléculas de adhesión y receptores inmunológicos (Curran y Kolakofsky, 2000).

Estos fenómenos permiten que el virus utilice células inmunes para viajar a órganos linfáticos secundarios (viremia primaria) como pulpa blanca del bazo, la lámina propia del estómago y del intestino delgado (placas de Peyer), los ganglios linfáticos mesentéricos y las células de Kupffer del hígado, esto alrededor del séptimo día PI (Greene y Appel, 1998; von Messling *et al*.,2004) que corresponden a los sitios de replicación preferencial antes del establecimiento de la viremia secundaria (von Messling *et al*., 2004b). En dichos tejidos el virus ejerce un efecto deletéreo sobre la respuesta inmune adaptativa antiviral con el agotamiento selectivo de los linfocitos CD4^{+} Th1 (Schobesberger *et al*., 2005; Pillet; von Messling, 2009) afectando también la actividad proliferativa de células B y T CD8+ involucradas en la respuesta Th1 durante las primeras 72 horas PI (Sidorenko y Clark 2003; von Messling *et al*., 2004b; Suter *et al*., 2005; Beineke *et al*., 2009).

De esta manera se da la severa leucopenia descrita entre el primer y séptimo día postinfección, con una disminución de hasta el 80% de las células mononucleares periféricas, y un 40-60% de linfocitos T y B infectados (Rudd *et al*., 2006). Pocos son los monocitos/macrófagos que expresan antígenos virales, lo que se relaciona directamente con su limitada expresión de CD150 (Cocks *et al*., 1995). La proliferación amplia del virus en órganos linfoides produce el aumento inicial de la temperatura corporal; coincidiendo con la aparición del interferón circulante (Lorenzana, 2008). La fiebre y linfopenia casi siempre pasan inadvertidas; la fiebre disminuye durante algunos días hasta que se desarrolla una segunda fase febril (de allí el nombre de "distemper"), que se caracteriza por altos títulos virales y el inicio del cuadro clínico (Rudd *et al*., 2006) como la conjuntivitis, rinitis y anorexia (Wheeler, 2007). En este curso de la virosis, el sulfato de heparina presente en la superficie de células epiteliales y no inmunes actúa como receptor para presentan algún grado de compromiso neurológico y, de ellos, un 10% muere de encefalitis aguda (Rudd *et al*., 2006).

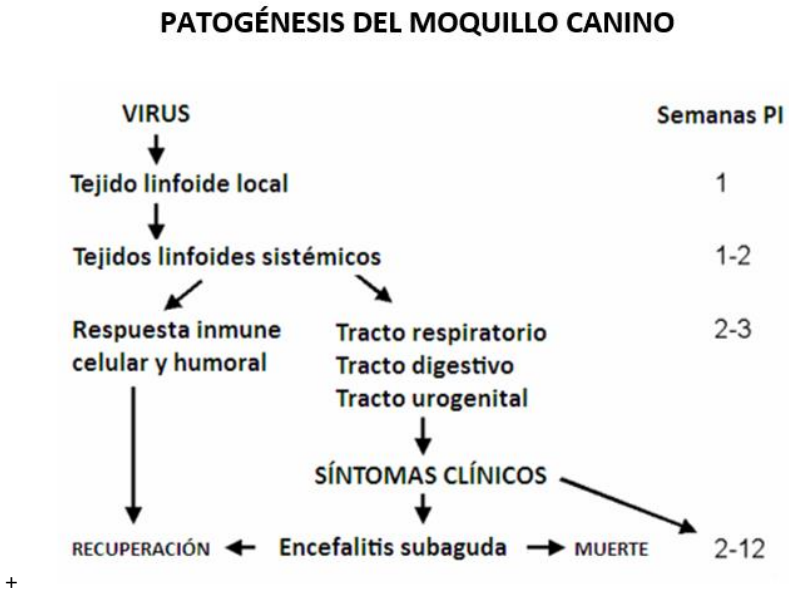
El establecimiento multisistémico y la viremia secundaria son etapas esenciales para que el virus asociado a células mononucleares y endoteliales infectadas alcance el Sistema Nervioso Central (SNC), a los ocho o nueve días PI (Craig, 2000), a través del plexo coroideo, sustentando la diseminación epiteliopantrópica propia de la fase más tardía de la infección (Rudd *et al*., 2006; Zhao *et al*.,2008), donde el desenvolvimiento de la enfermedad se vuelve muy impredecible (Summers y Appel 1994; Vandevelde y Zurbriggen 2005). Además, existen otras vías de ingreso, como la infección de neuronas receptoras luego de la invasión masiva de la mucosa respiratoria, donde a través de sinapsis neuronal, alcanzan el nervio y bulbo olfatorio, lugares donde comienza el proceso patológico, diseminándose luego al resto del SNC (Rudd *et al*., 2006).

Entre los días 9 a 14 días PI, se inicia la respuesta inmune humoral y celular (Lorenzana, 2008). Si la respuesta es adecuada y los anticuerpos neutralizantes se sintetizan alcanzando niveles adecuados el virus prácticamente no se propaga, es erradicado y los signos clínicos son leves (Nelson y Couto, 2000; Damien y Martina, 2002; Lorenzana, 2008), siendo el anticuerpo especifico IgG contra el virus del moquillo canino el más eficaz para neutralizarlo extracelularmente e inhibir su diseminación intercelular (Craig, 2000). El 75% de los perros infectados no presentan signos clínicos y se recuperan solos (Nelson y Couto, 2000).

Pero si la respuesta inmune es débil o tardía el virus del Moquillo canino invade todo el organismo (por ejemplo, las células epiteliales respiratorias, tejidos que incluyen piel, glándulas exocrinas, endocrinas y epitelio de los sistemas gastrointestinal, respiratorio y genitourinario), luego de lo cual puede darse una recuperación completa o desarrollar signos de la enfermedad del SNC (Nelson y Couto, 2000; Ettinger y Feldman, 2007). La recuperación se acompaña de inmunidad prolongada y finaliza con la eliminación viral

(**Figura 5**). El virus se elimina de la mayor parte de los tejidos del cuerpo a medida que aumentan los títulos de los anticuerpos, pero puede persistir por periodos prolongados como virus completo en el tejido uveal, neuronas y en tegumentos de las almohadillas plantares (Craig, 2000).

La respuesta de anticuerpos se ha separado en determinantes de envoltura y del centro viral. Al parecer solo los perros que producen anticuerpos anti-envoltura son capaces de detener una infección viral persistente del SNC. El resultado de la infección del SNC depende aparentemente de la aparición de anticuerpos IgG circulantes contra la glicoproteína H (Craig, 2000).



+

Figura 5. Esquema de la patogénesis del moquillo canino. PI: Post infección (Modificado de Appel y Summers, 1999).

2.2.2 Presentaciones clínicas

En los perros, las presentaciones clínicas pueden variar desde cuadros sistémicos agudos a crónicos, con elevadas tasas de mortalidad. Asimismo, la gravedad de los signos clínicos observados depende de la virulencia del virus infectante, condiciones ambientales, así como la edad del hospedero y su estado inmunológico. Esto puede resultar en una infección subclínica o una presentación de cuadros de las vías respiratorias, ocular, signos gastrointestinales, neurológicos y cutáneos o lesiones, que aparecen de forma simultánea o secuencial. Los signos nerviosos pueden estar presentes en la forma crónica del moquillo canino junto con otras manifestaciones, o bien, pueden presentarse signos nerviosos de forma independiente. Entre los signos sistémicos pueden observarse la apatía, anorexia, deshidratación, fiebre y descarga serosa oculonasal. La secreción nasal con frecuencia progresa a mucopurulenta, con tos y dificultad para respirar. Los signos de infección del sistema nervioso, se observan con frecuencia entre una y tres semanas después de que los animales afectados se recuperan de la forma sistémica del virus del Moquillo canino. Sin embargo, signos nerviosos también pueden presentarse simultáneamente con la enfermedad sistémica o, menos comúnmente, meses después de la infección (Pardo, 2006).

2.2.3 Epidemiología

El moquillo canino es una de las enfermedades virales más importantes en cánidos silvestres y domésticos del mundo. Puede comprometer drásticamente la conservación de las especies amenazadas debido a su alta letalidad (Johnson *et al*., 1995).

Es una enfermedad de alta prevalencia, morbilidad y mortalidad (Espinal y Ruizet, 2011). La morbilidad varía del 25-75% y la letalidad asociada a menudo alcanza el 50-90% dependiendo de la cepa de virus actuante (Navarrete, 2008).

Se estima que entre el 25 y 75% de los perros susceptibles se infectan subclínicamente, eliminando el virus del cuerpo sin mostrar signos de enfermedad (Lorenzana, 2008), lo que puede estar relacionado con la variedad de cepas del virus, que difieren por la gravedad del cuadro que producen, por ejemplo, provocando afecciones leves y subclínicas (Chappuis, 1995), hasta algunas que presentan encefalitis y una alta mortalidad (Olson *et a*l., 1996).

Los hospederos del virus del moquillo canino incluyen numerosas familias del orden de los carnívoros como *Canidae* (perros, zorros), *Procyonidae* (mapaches), *Mustelidae* (hurones y visones), *Mephitidae* (zorrillos), *Hyaenidae* (hienas), *Ursidae* (osos), *Ailuridae* (pandas rojos), *Viverridae* (ginetas, civetas) y *Felidae* (tigres, leones, leopardos, jaguares), presentándose inclusive en mamíferos marinos como pinnípedos y cetáceos.

El moquillo canino se ha observado en grandes felinos, en el Parque Nacional del Serengeti de Tanzania en 1994, en los zoológicos de América del Norte en 1991 y 1992, en focas del Lago Baikal y Mar Caspio en 1988 y en pecaríes de collar (*Tayassu tajacu*) en Arizona. Asimismo, la enfermedad del moquillo canino se ha presentado en primates no humanos, macaco japonés (*Macaca fuscata*) infectado naturalmente por primera vez en 1989 en Japón y en el 2006 en China, en monos Rhesus (*Macaca mulatta*), donde 10,000 animales fueron infectados (Appel y Summers, 1999; Martella *et al*., 2008; Summers y Appel, 1994).

En el año 2003 ocurrió un brote de moquillo canino en las poblaciones de zorros endémicos del Parque Nacional Fray Jorge (Región de Coquimbo), el cual se especuló que podría estar relacionado con la existencia de mustélidos nativos como el chingue y el quique (Moreira y Stutzin, 2005). Además, en el 2007, hubo un brote de moquillo canino en la isla Robinson Crusoe (Región de Valparaíso), donde fueron afectados varios perros domésticos, pero no los lobos marinos endémicos de la isla (Jara et al., 2007).

2.2.4 Prevención y control del virus del moquillo canino

Las vacunas utilizadas en su mayoría corresponden a vacunas polivalentes de virus atenuados, las cuales confieren una limitada protección a los individuos y además tienen el riesgo de provocar la enfermedad en los mismos, ya que mantienen su linfotropismo y capacidad de inducir inmunosupresión, sobretodo en animales inmunodeprimidos o menores de 6 meses (Martella *et al*., 2008).

Otras alternativas que presentan una mayor seguridad que las anteriores, son las vacunas recombinantes, que prescinden del patógeno y utilizan algunos de sus antígenos para estimular adecuadamente al sistema inmune del hospedero. Estas vacunas muestran una gran eficacia, con una producción de anticuerpos de mayor afinidad y duración que las vacunas de virus atenuados (Larson y Schultz, 2006).

Considerando que los cachorros no son inmunocompetentes antes de las ocho semanas de vida y que los anticuerpos maternos duran en el recién nacido aproximadamente entre ocho y diez semanas, se recomienda vacunar a las seis semanas de edad y para superar la posible interferencia de los anticuerpos maternos, se debe repetir la vacunación cada 3 semanas hasta las 12 semanas (2 dosis más), debiendo repetir una vacunación anualmente (Berríos y Durán, 2005).

2.2.5 Diagnóstico de la infección por el virus del moquillo canino

El amplio espectro de signos clínicos dificulta el diagnóstico del moquillo canino, y hace necesaria la confirmación a través de exámenes de laboratorio (Pardo, 2006). Debido a lo anterior, existen diversas técnicas para el diagnóstico de esta enfermedad. Entre estas, se encuentra el diagnóstico histológico, en el cual se revelan cuerpos de inclusión intranucleares e intracitoplasmáticos en numerosos tejidos. Los métodos serológicos, tales como el inmunoenzimático (ELISA) y ensayos de seroneutralización, buscan la detección de anticuerpos específicos para el virus del moquillo canino. En el análisis de líquido cefalorraquídeo (LCR) es posible observar, un aumento de los títulos de inmunoglobulina anti-virus del moquillo canino (IgG e IgM) que son altamente sugestivos de infección por el virus del moquillo canino, además de un incremento de concentración de proteína (> 25 mg / dL) y recuento de células (10 células / mL con un predominio de linfocitos) que se observan en formas inflamatorias del virus del moquillo canino, como en una encefalomielitis (Elia *et al*., 2006; Pardo, 2006). Todas estas técnicas tienen la desventaja del diagnóstico de falsos positivos, si se realizan postinmunización con vacuna. Sin embargo, el uso de la técnica molecular de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, en inglés) como prueba diagnóstica produce resultados más precisos, debido a que puede identificar la presencia del virus por medio de la información genética de éste en las células infectadas (Rzezutka y Mizak, 2002).

2.2.5.1 RT-PCR punto final

La reacción en cadena de la polimerasa asociada a transcripción inversa (RT-PCR), consiste en una amplificación exponencial de fragmentos de ADN del virus, previa transcripción inversa desde ARN a ADN complementario, permitiendo detectar la presencia del ARN del virus tempranamente, siendo a diferencia de las otras técnicas mencionadas, una prueba sensible, específica y rápida para el diagnóstico del virus

del moquillo canino y puede resultar positiva aun cuando otras pruebas no logran detectar al virus (Appel y Summers, 1999; Frisk *et al*., 1999; Martella *et al*., 2008).

Generalmente, para la detección del virus del Moquilo canino por PCR se utilizan como principales blancos para la amplificación, regiones conservadas dentro del genoma viral, como el gen de la proteína de la nucleocápside (gen *n*) (Frisk *et al*., 1999) Sin embargo, se ha utilizado el gen de la hemaglutinina (gen *h*), el cual presenta mayor variación antigénica y genética entre los genes del virus y recientemente también el gen de la proteína fusión (F), el cual presenta este tipo de variación (Jara, 2011).

Si bien la RT-PCR en tiempo final se utiliza comúnmente en ensayos de diagnóstico molecular, presenta algunas limitaciones tales como el bajo rendimiento de la misma en muestras con títulos virales discretos, y problemas de contaminación asociados a la manipulación del amplicón (Elia *et al.*, 2006).

2.2.6 Caracterización genética del virus del moquillo canino

La amplificación por RT-PCR en tiempo final y posterior secuenciación de los amplicones permite conocer y comparar los aislamientos de las muestras de campo, con el fin de establecer sus niveles de variabilidad genética respecto a aislamientos de diferentes regiones geográficas y las cepas vacunales. En los estudios de caracterización los blancos de amplificación son genes o regiones genómicas con altos niveles de variabilidad genética.

2.2.6.1 El gen de la hemaglutinina como herramienta para la genotipificación del virus del moquillo canino

El gen H es el más variable del genoma de los *Morbillivirus*. A nivel de su secuencia aminoacídica se detectan valores de divergencia del 8% entre aislamientos de campo, y de hasta 11% respecto a las cepas vacunales (Martella et al., 2006).

Con base en el análisis de la hemaglutinina se han descrito los linajes del virus del moquillo canino circulantes en el mundo. El criterio establece que dos aislamientos pertenecen a un mismo linaje si se

agrupan dentro de un mismo cladograma en la filogenia y presentan una variación aminoacídica menor al 4%. Si las muestras se agrupan en cladogramas distintos y presentan valores de divergencia mayores al 4%, pertenecen a linajes diferentes (Martella et al., 2006). Los linajes del virus del moquillo canino se distribuyen según un patrón de distribución geográfica, salvo escasas excepciones (Martella et al., 2006). Hasta el 2017 se han identificado catorce linajes en el mundo: Asia-1, Asia-2, Asia-3, Asia-4, Europa 1, Europa 2, Europa 3, Rockborn, América-1, América-2, África, América del Sur-1, América del Sur-2 y América del Sur-3 (Espinal *et al.*, 2014).

En México la secuenciación de los genes *n*/ *h*, permitió identificar un nuevo grupo genómico de al menos 10 geno-variantes lejanamente relacionadas con las cepas de vacunación y otras cepas de campo identificadas globalmente. Además, se encontró que las cepas de campo mexicanas difieren de las cepas de la vacuna Ondesterpoort en la N-glicosilación que conservan las cepas de campo (Gámiz *et al.*, 2011).

La proteína H es el determinante principal del tropismo celular ya que interactúa con el receptor SLAM mediante aa de reconocimiento específicos (Seki *et al.,* 2003). El modelado de su estructura permitió identificar que los residuos 530 y 549 están involucrados en la adsorción viral mediada por el receptor SLAM (von Messling et al 2005; McCarthy et al., 2007). El análisis de aislamientos de campo determinó que dichos residuos difieren entre cepas aisladas de hospederos domésticos y silvestres. En el residuo 530 se observan los aa glicina (G) y ácido glutámico (E) en la mayoría de los aislamientos de canes domésticos, mientras que las cepas aisladas de especies silvestres muestran los aa aspartato (D), asparagina (N) y arginina (R). A nivel del residuo 549, el aa tirosina (Y) es característico de aislamientos de canes, mientras que en aislamientos de silvestres se registra la sustitución por histidina (H), sugiriendo que la dispersión del virus a otros hospederos podría asociarse a cambios en estos sitios (McCarthy *et al*., 2007).

Las cadenas de N-glicanos presentes en la proteína H también podrían influir sobre las interacciones con el receptor SLAM y el ingreso del virus a la célula. Se demostró en otras glicoproteínas de *Paramyxovirus* que la N-glicosilación es fundamental para el correcto plegamiento, transporte y función de la proteína (von Messling *et al*., 2001). El posible papel de la N-glicosilación en la fisiología de la hemaglutinina del virus del moquillo canino se analizó mediante la construcción de variantes con la proteína H sin glicosilar. Los virus con proteína H desglicosilada mantenían su funcionalidad, aunque presentaban un fenotipo atenuado *in vivo,* demostrando que se requiere un mínimo de N-glicanos para la virulencia (Sawatsky y von Messling, 2010).

2.2.6.2 Péptido señal de la proteína de fusion (F)

El gen *f* es el segundo más variable dentro del genoma del virus del moquillo canino. A nivel de su secuencia aminoacídica, la proteína F varía en torno al 4% entre aislamientos de campo. Sin embargo, los primeros 135 aa correspondientes al Fsp varían hasta en un 27% (von Messling y Cattaneo, 2002). La comparación entre aislamientos de campo y la cepa vacunal Ondersepoort, mostró valores de variabilidad aminoacídica entre 30 y 49% (Plattet et al., 2007; Lee et al., 2008; Sultan et al., 2009). Los valores de variabilidad de la región Fsp son incluso superiores a los descritos para la hemaglutinina, comenzándose a utilizar en estudios de caracterización y evolución del virus del moquillo canino (Lee et al., 2008; Sultan et al., 2009).

El Fsp no se encuentra en las partículas virales debido a que la maduración de la proteína F requiere su procesamiento proteolítico. Sin embargo, estaría involucrado indirectamente en la actividad de la proteína F, limitando su expresión a nivel intracelular y en la superficie (Plattet et al., 2007). Esta región también contribuiría a la virulencia e incluso en la patogénesis viral (von Messling y Cattaneo 2002; Plattet et al., 2007). Se han analizado los efectos de la eliminación de aa del Fsp y su posible relación con la función de la proteína; la deleción de los primeros 60 aa determinó un incremento de la actividad de fusión de 15 órdenes, mientras que la reducción adicional del Fsp a 8 aa resultó en un incremento de 70 órdenes en la actividad de fusión, sustentando que el acortamiento del Fsp determina un incremento en la fusogenicidad viral (von Messling y Cattaneo, 2002). Sin embargo, estudios *in vivo* sugieren que el péptido señal no es esencial para la virulencia, ya que infecciones experimentales con virus carente del Fsp, resultaron en el desarrollo de la enfermedad y la muerte de los animales (Anderson y von Messling, 2008).

2.2.7 Tratamiento del virus del moquillo y nuevas alternativas

Después de más de 100 años del hallazgo de este virus y siendo su infección causa de una elevada morbilidad y letalidad en caninos, aún no existe un tratamiento estandarizado que permita aumentar la sobrevivencia de los animales afectados sin secuelas severas (Céspedes et al., 2010).

Al tratarse de una enfermedad viral que involucra diferentes órganos o sistemas, el tratamiento convencional es inespecífico y de sostén, debido a la carencia de terapias específicas con fármacos antivíricos, por lo que debe adaptarse a cada caso particular. Básicamente deben tratarse los signos clínicos y controlarse las infecciones bacterianas secundarias. En los últimos años se han adoptado

alternativas terapéuticas que consisten en estimular la respuesta inmune innata empleando agentes inmunomoduladores y fármacos que limiten la acción del virus afectando su replicación (Greene and Appel, 2006).

Entre los agentes inmunomoduladores están los lipopolisacáridos y fracciones bacterianas, los cuales están indicados para potenciar la respuesta del sistema inmune, como terapia de apoyo en enfermedades virales o bacterianas, en el tratamiento de afecciones que deprimen el sistema inmunitario y como terapia antiestrés. Sin embargo, no se dispone de reportes de ensayos clínicos que avalen científicamente la eficacia del empleo como coadyuvante en la terapéutica del moquillo canino (Pinotti, 2012).

Lorenzana (2008) habla de la administración precoz durante la fase de incubación o de viremia de un antisuero específico. Sin embargo, una vez que el virus alcanza los epitelios, resulta inaccesible para los antisueros séricos.

Actualmente se han probado dos fármacos con efecto antiviral sobre el virus del moquillo canino: azatioprina y ribavirina. La primera ha logrado limitar el avance del cuadro multisistémico, aumentar la sobrevida y reducir la presentación del cuadro neurológico, pero sólo se debe usar en aquellos pacientes que reciban una antibioticoterapia y que no presenten trombocitopenia, gastroenteritis hemorrágica o anemia moderada a severa ya que puede producir severas complicaciones en ellos. La ribavirina, posee un efecto terapéutico demostrado en las virosis causadas por los virus de hepatitis C humano y sarampión, siendo este último el miembro del género *Morbillivirus* genéticamente más cercano al virus del moquillo canino. Sin embargo, es de limitado acceso para los médicos veterinarios y sus propiedades farmacocinéticas son desconocidas en *Canis familiaris*. (Céspedes *et al.,* 2010).

En cuanto al control de la inflamación del tejido nervioso existen dos alternativas terapéuticas utilizadas por Iruretagoyena et al., (2006): andrografolido y rosiglitazona. Ambas se caracterizan por inhibir NF-κB, principal responsable de la activación de los genes de citocinas proinflamatorias que corresponden a los mediadores más importantes del progreso de la enfermedad (Iruretagoyena *et al.*, 2006). La inhibición de NF-κB puede complementarse adicionalmente utilizando N-acetil-cisteína (NAC), un antioxidante inmunomodulador cuyo mecanismo de acción incluye la inhibición de la unión al ADN de NF-κB (Lappas *et al*., 2003).

Otro fármaco que también se ha probado, sobre todo cuando la rosiglitazona empieza a tener efectos colaterales por su uso crónico, es la espironolactona, que no tiene los efectos adversos de los fármacos

anteriormente mencionados y posee la capacidad de inhibir respuestas inmunes patológicas del tipo Th17. Por otro lado, se ha demostrado que la vitamina A posee un papel importante en la adquisición de un fenotipo regulador de los linfocitos T (Herrada et al., 2010), fenómeno que se ha observado en patologías inflamatorias a nivel del sistema digestivo, aunque aún no se ha comprobado en el caso del moquillo canino (von Boehmer, 2007).

Es importante mencionar el uso equivocado del interferón gamma recombinante humano (IFN-γ rh) y la vitamina C, que son en algunos lugares ampliamente usados en procesos infecciosos virales. Esto se debe a que el IFN-γ corresponde a una citocina con funciones esenciales en la restricción de la replicación y diseminación multisistémica de agentes virales, mientras coordina la actividad de linfocitos Th1 y citotóxicos (Placek *et al.,* 2009), pero su uso debe restringirse a animales que sólo hayan sido expuestos, pues únicamente es efectivo en etapas tempranas de la infección cuando aún no se ha irrumpido con el normal funcionamiento de la respuesta Th1. El uso del IFN-γ rh en pacientes con sintomatología nerviosa es contraproducente debido a que exacerba el daño sobre el SNC mediante el estímulo de poblaciones funcionalmente dependientes de IFN-γ: linfocitos Th1 $CD4^+$ y $CD8^+$ efectores.

Asimismo, para minimizar el daño inicial sobre la mielina, el uso de antioxidantes, vitamina E, vitaminas del complejo B y altas dosis de vitamina A corresponden a medidas terapéuticas esenciales (Noh *et al.,* 2005).

Hay estudios de compuestos antivirales en el tratamiento del moquillo canino que están en curso y que todavía necesitan varios experimentos futuros para determinar su seguridad y eficacia en varias especies. Krumm *et al.,* evaluaron un inhibidor de *Panmorbilivirus* con capacidad de almacenamiento estable, disponible oralmente, que se dirige a la polimerasa viral (Krumm, *et al.,* 2014). Otros compuestos como el fucoidano, un polisacárido sulfatado encontrado en algas cafés, también ha sido evaluado por su capacidad de actuar como fármaco antiviral contra el virus del moquillo canino. Resultados *in vitro* mostraron que el fucoidano es capaz de inhibir los pasos iniciales del ciclo de replicación viral, suprimiendo fuertemente la formación de sincitios en las células infectadas. Carvalho y colaboradores evaluaron la actividad antiviral de varios flavonoides (quercetina, morina, rutina y hesperidina) y ácidos fenólicos (ácidos cinámicos, trans-cinámico y ferúlico), concentrándose en su capacidad *in vitro* para inhibir etapas del ciclo de replicación del virus del moquillo canino. Todos los flavonoides y ácidos fenólicos demostraron acción antiviral contra la infección de dicho virus (Carvalho O.V., *et al.,* 2013). Otros métodos para tratar el moquillo canino que se han explorado incluyen es la terapia con células madre mesenquimales (Pinheiro A.O., *et al.,* 2016).

2.3 Actividad antiviral de las AgNPs

Las AgNPs presentan muchas aplicaciones, una de ellas es el efecto inhibitorio de distintos microorganismos, entre ellos los virus. Por ejemplo, en un estudio publicado en el año 2017 por Vazquez-Muñoz y colaboradores, hicieron un análisis comparativo de los efectos tóxicos de las AgNPs sobre sistemas biológicos de diferentes niveles de complejidad. Las AgNPs analizadas estaban recubiertas con polivinil pirrolidona (PVP) y los organismos que se analizaron fueron virus, bacterias (Gram-positivas y Gram-negativas), protistas, hongos, líneas celulares humanas de cáncer y animales. Los resultados indicaron que las AgNPs ejercieron efectos inhibitorios en todos los modelos biológicos probados *in vitro* a concentraciones similares en el orden de magnitud cerca de 10^1 µg/ml de AgNPs, probando así que la complejidad de los sistemas biológicos no es determinante para que las AgNPs ejerzan su efecto tóxico. La **tabla 1** muestra las concentraciones inhibidoras eficaces de AgNPs en los sistemas biológicos que se evaluaron. En el caso de los ensayos en células Vero infectadas por el el virus de la fiebre del Valle del Rift (RVFV), se necesitaron pocas cantidades de AgNPs para reducir la infectividad del RVFV. Las unidades formadoras de placas se redujeron un 82% con 6 µg/ml y un 98% a una concentración de 12 µg/ml de AgNPs (Vazquez-Muñoz et al., 2017; Borrego et al., 2016).

Tabla 1. Concentraciones efectivas inhibitorias de AgNPs en sistemas biológicos.

Grupo	Organismo/Línea celular	Concentración inhibitoria de AgNPs (µg/ml)
Virus	RVFV	CE_{98}= 12
Bacteria	*E. coli* (Gram negativo)	CMI = 12
	S. aureus (Gram positivo)	CMI = 12
Hongo	*C. albicans* (levadura)	CMI = 45
	F. oxysporum (filamentoso)	CMI = 20
Protista	*Rhodomonas sp.*(microalga)	CMI = 4
Líneas celulares animales	Vero	DL_{90}= 7.5
	Dendrítica (murino)	DL_{100} = 10
Líneas celulares humanas de cáncer	Hela	DL_{100} = 10
	MDA-MB-231	DL_{100} = 10

CE (Concentración efectiva); CMI (Concentración mínima inhibitoria); DL (Dosis letal).

Asimismo, en este estudio se realizó una búsqueda exhaustiva en la literatura sobre la concentración mínima inhibitoria (CMI) de las AgNPs en organismos de diferentes niveles taxonómicos, encontrándose que a pesar de las diferencias en el amplio espectro de AgNPs reportadas, la mayoría tienen propiedades

inhibitorias en el mismo rango de concentración de plata metálica, que es de 10^1 µg/ml de AgNPs. Por lo que las propiedades inhibidoras pueden deberse a la liberación de iones de plata, en lugar de a las características de las nanopartículas *per se* (Vazquez-Muñoz et al., 2017).

En otro estudio publicado el año 2016, se investigó a las AgNPs recubiertas con PVP como agente antiviral contra la infección del virus de la mancha blanca en camarones (WSSV, del inglés White Spot Syndrome Virus). La inyección de AgNPs en camarones blancos juveniles infectados con WSSV dio como resultado una tasa de supervivencia del 80% de los animales 96 horas después de la infección sin ser tóxico y no causando estrés en los organismos (Juarez-Moreno et al., 2017).

De igual manera en el 2016 se publicó un estudio en el que se probó el potencial antiviral de las AgNPs contra la infección por el RVFV tanto en cultivo celular como en ratones. Revelando la posible aplicación de AgNPs para controlar la infección de este importante patógeno zoonótico. Ya que los resultados *in vitro* mostraron que las AgNPs reducen la infectividad de RVFV de una manera dependiente de la dosis. A una dilución de 1/8000, la infectividad se redujo en sólo 10%, mientras que se alcanzó una reducción de más del 80% a una dilución de 1/2000. Cuando el virus se preincubó a la dilución 1/1000 (12 µg/ml de plata metálica), se alcanzó una reducción de la infectividad del 98%. Por lo que los resultados mostrarón que la infectividad del RVFV se ve afectada drásticamente por la interacción con las nanopartículas de plata. De manera similar, los ratones inoculados con una dosis letal de virus previamente incubados con 1.2 mg/ml de AgNPs mostraron una enfermedad clínica de inicio tardío y mortalidad, con una tasa de supervivencia del 60% (Borrego et al., 2016).

Existen otros estudios donde se ha demostrado actividad de las AgNPs contra un amplio espectro de familias de virus, entre los que se encuentran el virus de inmunodeficiencia humana tipo 1 (HIV-1, del inglés human immunodeficiency virus type 1), hepatitis B, virus sincicial respiratorio, herpes simple tipo 1 y 2, virus de la viruela del mono, virus de la influenza H1N1 y virus tacaribe (Galdiero *et al*., 2011). En el caso del HIV-1 se demostró que las AgNPs muestran una interacción dependiente del tamaño (1 -10nm) con los residuos sulfuro de la glicoproteína gp120, que inhibe la infectividad del virus tal cómo se observa en la **figura 6** (Elechiguerra *et al*, 2005). En otro estudio se reportó que la adición de AgNPs aumentan la neutralización de los anticuerpos *in vitro* en células infectadas por HIV-1 (Lara, *et al*., 2011).

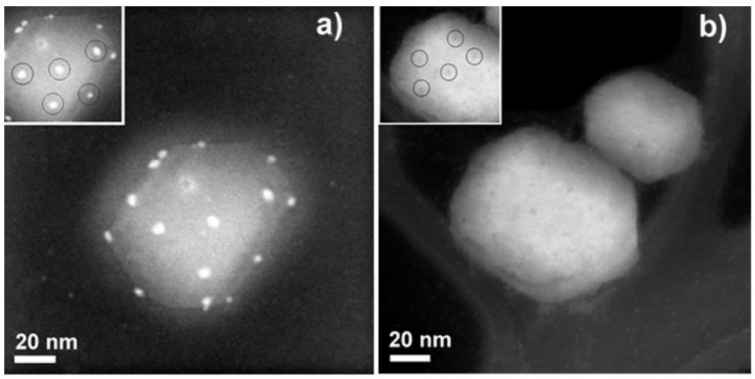


Figura 6. Micrografía de VIH-1 expuesto a AgNPs. Imagen obtenida por microscopía electrónica de transmisión de muestra (a) tratada con nanopartículas y (b) una muestra control (Elechiguerra *et al.*, 2005).

Los mecanismos de acción del efecto antiviral de las AgNPs sobre algunos de los virus estudiados se resumen en la **tabla 2** (Galdiero et al., 2011).

Tabla 2. Efecto antiviral de las nanopartículas de plata.

Tipo de virus	Familia	Composición química del recubrimiento y tamaño de AgNPs	Mecanismo de acción
Virus de inmunodeficiencia humana tipo 1	*Retroviridae*	Recubiertas con polivinilpirrolidona (PVP). De 1-10 nm	Interacción con gp 120
Virus Herpes simple tipo 1	*Herpesviridae*	Recubiertas con mercaptoetanosulfonato (MES). De 4 nm.	Competencia por la unión del virus a la célula
Virus sincitial respiratorio	*Paramyxoviridae*	Recubiertas de PVP. De 69 ± 3 nm	Interferencia con el acoplamiento viral.
Virus de la viruela del mono	*Poxviridae*	AgNPs sin recubrimiento y recubiertas con polisacárido. De 10 a 80 nm.	Bloquea la unión y penetración del virus a la célula hospedera.
Virus de la influenza	*Orthomyxoviridae*	AgNPs con quitosano. De 3.5-12.9 nm.	Interacción con los viriones
Virus tacaribe	*Arenaviridae*	AgNPs sin recubrimiento y recubiertas de polisacárido. De 10 nm.	Inactivación de las partículas víricas antes de entrar.
Virus de hepatitis B	*Hepadnaviridae*	AgNPs sin recubrimiento De 10-50 nm.	Interacción con la doble cadena de ADN y/o la unión con las partículas víricas.

Debido a la gran variedad de familias de virus con los que las AgNPs tienen interacción, se ha planteado la hipótesis de que las AgNPs interaccionan con las proteínas de la superficie de los virus. La interacción directa de las AgNPs con las glicoproteínas de la superficie viral, favorecería su ingreso a la célula para ejercer su actividad antiviral a través de interacciones con el genoma viral (ADN o ARN). Además, el citoplasma de una célula infectada con el virus del moquillo canino, está sobrepoblado por factores celulares codificados por la infección vírica y son necesarios para permitir la replicación y producción adecuada de viriones. La interacción de las nanopartículas metálicas con estos factores de replicación viral pueden explicar uno de los mecanismos de inhibición del virus mediada por las AgNPs (**Figura 7**).

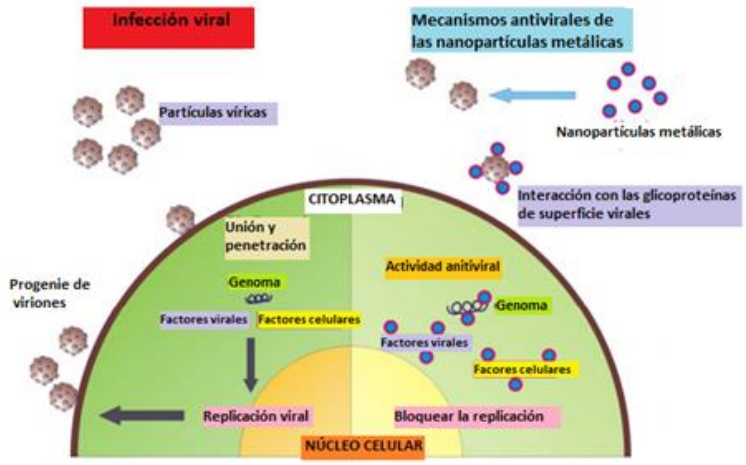


Figura 7. Modelo esquemático de un virus que infecta una célula eucariótica y mecanismo antiviral de nanopartículas metálicas (Modificado de Galdiero et al., 2011).

No obstante, para que las nanopartículas metálicas se utilicen como un tratamiento terapéutico o profiláctico, es fundamental evaluar su toxicidad *in vivo* y las secuelas potenciales a largo plazo asociadas con la exposición a éstas. Debido a esto es que las investigaciones para determinar cómo diseñar, usar y eliminar de manera segura los productos que contienen nanomateriales metálicos sin crear nuevos riesgos para los seres humanos o el medio ambiente que resultan de gran importancia (Galdiero et al., 2011).

2.3.1 Evaluaciones toxicológicas

Los efectos tóxicos de las AgNPs, se pueden asociar a su tamaño y forma, a la liberación de plata iónica, o a ambos. Además, los recubrimientos de superficie de las AgNPs pueden afectar su comportamiento químico (López-Serrano Oliver, 2014).

En términos de seguridad, el efecto de las AgNPs es una consideración importante: incluso si inhiben las infecciones virales, no sería beneficioso si hay efectos adversos para los seres humanos o los animales. Una estrategia comúnmente utilizada para reducir una posible toxicidad es usar varios agentes de recubrimiento para evitar el contacto directo del metal con las células (Galdiero et al., 2011).

Varios estudios han demostrado los efectos citotóxicos de las nanopartículas metálicas, de hecho, se ha reportado que las AgNPs son citotóxicas para las células de mamíferos. Esto se ha determinado por la evaluación de la función mitocondrial, la fuga de lactato deshidrogenasa de la membrana y la presencia de una morfología celular anormal (Hussain, S.M., et al., 2005). A nivel celular, las nanopartículas metálicas interactúan con moléculas biológicas dentro de las células y pueden interferir con el mecanismo de defensa antioxidante que conduce a la generación de especies reactivas del oxígeno (*ROS*, en inglés). Tales especies, en exceso, pueden causar daño a algunos componentes biológicos a través de la oxidación de lípidos, proteínas y ADN. El estrés oxidativo juega un papel primordial en la inducción o el aumento de la inflamación a través de la regulación positiva de los factores de transcripción sensibles a la óxido-reducción (por ejemplo, NF-κB), la proteína activadora 1 y las citocinas implicadas en la inflamación (Rahman, I., 2000).

Se ha demostrado que existe una inducción de daño al ADN y anomalías en el ciclo celular, mediada por las ROS de células expuestas a AgNPs (AshaRani, P.V., et al., 2009). La mayoría de los estudios *in vitro* muestra que existe una relación entre la concentración de ROS y el daño celular. De hecho, las concentraciones más altas de plata metálica, inducen una toxicidad celular más fuerte. Sin embargo, se debe considerar que las concentraciones *in vitro* de nanopartículas son a menudo mucho más altas que las utilizadas en experimentos *in vivo*, por lo tanto, tales exposiciones, no representan una réplica de las condiciones esperadas (Galdiero et al., 2011).

De forma reciente, Juarez-Moreno et al., reportaron que existen algunas AgNPs capaces de inducir la formación de ROS pero sin ocasionar daño al ADN, lo cual hace de estas nanopartículas herramientas importantes para la biomedicina. Ya que, al conservar los mismos efectos citotóxicos, pero no genotóxicos,

son capaces de eliminar a las células infectadas sin ocasionar efectos colaterales en el material genético (Juarez-Moreno, K., et al., 2016).

2.3.2 Evaluación *in vivo* de AgNPs

Un estudio determinó el perfil farmacocinético de las AgNPs en perros de la raza Beagle. Para ello se utilizaron 4 perros machos adultos a los cuales se les administró 5 mg/Kg de las AgNPs vía intraperitoneal en dosis única. Posteriormente se les tomaron 19 muestras de sangre durante 35 días (Triana Verástegui, 2014). En los parámetros farmacocinéticos se obtuvo una vida media (t½) de 98.5 horas, una concentración máxima (Cmáx) de 291 µg/dL que se alcanzó un tiempo máximo (Tmáx) de 6.5 horas y un área bajo la curva (ABC) de 22931.4µg/dL. La plata presentó un fenómeno de redistribución a los 3 días posteriores a la administración de las AgNPs. Asimismo, a los perros se les realizaron estudios de laboratorio una semana después de la administración de las AgNPs, observándose una disminución en los parámetros de los glóbulos rojos y un aumento de los leucocitos en todos los perros. Además, en algunos de ellos se observó elevación de las enzimas hepáticas, sin embargo, los perros presentaron un buen aspecto general. En los exámenes de laboratorio realizados al mes del estudio, se encontraron niveles normales en los resultados de la biometría hemática y del perfil bioquímico.

En otro estudio, se comprobó el efecto antiviral de las AgNPs contra el virus del moquillo canino, en éste, se administraron a pacientes con moquillo canino y se cree que el efecto fue producto de la interacción de las AgNPs con las glicoproteínas que presenta el virus en su superficie. Dicho tratamiento se basó en la administración vía oral de 6% de AgNPs y 94% de solución de polivinilpirrolidona con nanopartículas en el rango de 0.5 a 100 nm, administrando 1.8 mg de AgNPs/kg/día por un periodo de 7 a 15 días en pacientes sin signología nerviosa y para pacientes con signología nerviosa fue la misma dosis cada 12 horas, es decir, el doble de la dosis por día y durante 25 a 28 días. Este tratamiento proporcionó una tasa de recuperación de más del 90% en pacientes que no presentaban signología nerviosa y éstos sanaron sin secuelas. Para confirmar que los pacientes eran portadores recientes del virus se usó como marcador la inmunoglobulina M (IgM) específica contra el virus del moquillo canino, la cual persiste durante al menos 3 meses después de la infección. Es importante hacer mención que en los pacientes que presentaron valores altos de IgM en las primeras etapas de la enfermedad, la recuperación fue favorable, mientras que en pacientes con signología nerviosa la respuesta inmune fue baja en la mayoría y esto condujo al fracaso del tratamiento (Bogdanchikova *et al*., 2016).

Debido a que las concentraciones de AgNPs varían dependiendo del tejido en el que se encuentran, es posible que las AgNPs no lleguen a la concentración terapéutica requerida en el sistema nervioso para actuar contra el virus cuando ya se encuentra ahí (Bogdanchikova *et al*., 2016). Asimismo, las AgNPs pueden no tener el mismo efecto en los diferentes genotipos del virus, ya que hay algunas cepas que causan signología nerviosa y pueden también afectar de la misma forma la respuesta del sistema inmune.

Por lo tanto, la respuesta inmune es un factor muy importante y de la misma forma lo puede ser la concentración en la que se encuentran las AgNPs en los distintos tejidos, puesto que éstas pueden atravesar la barrera hematoencefálica de tal forma que se pueden usar concentraciones más elevadas en pacientes que presenten signología nerviosa para que existan más nanopartículas en el sistema nervioso y puedan tener un efecto antiviral contra el virus del moquillo canino. De la misma manera es importante determinar cuáles son los genotipos del virus que causan la signología nerviosa o tienen afinidad por el tejido nervioso y evaluar si son afectados por las AgNPs. En este trabajo se determinará si la eficacia antiviral de las AgNPs está relacionada con el genotipo del virus de moquillo canino.

Capítulo 3. Justificación, Hipótesis y Objetivos

3.1 Justificación

El moquillo canino es la enfermedad infecciosa que produce más muertes en perros domésticos a pesar de que ya hay vacunación contra dicha enfermedad. Sin embargo, solamente se ha logrado disminuir la tasa de mortalidad, pero no su control o erradicación. Esto se debe a que son muchos los factores que influyen para el desarrollo del moquillo, como la re-vacunación de los perros debido a la poca memoria inmunológica que se produce y la variabilidad genética que presentan los distintos genotipos del virus, entre otros.

El número de casos de pacientes vacunados que se llegan a enfermar de moquillo se ha incrementado a nivel mundial debido a la aparición de nuevos genotipos provenientes de hospederos silvestres, por lo tanto, la incidencia de las infecciones sigue siendo algo alarmante. Por esta razón, se están buscando nuevas alternativas eficaces para atacar al agente causal y dado que existe un reporte de un tratamiento antiviral efectivo con AgNPs, se decidió evaluar la eficacia de ese tratamiento está relacionada con el genotipo viral de una muestra de pacientes infectados con moquillo en la ciudad de Ensenada, Baja California. De esta forma, será posible proveer de un método confiable y efectivo de diagnóstico y tratamiento de los pacientes infectados.

3.2 Hipótesis

La eficacia de las AgNPs como antivirales depende del genotipo del virus de moquillo con que se haya infectado el paciente.

3.3 Objetivos

3.3.1 Objetivo General

Llevar a cabo la genotipificación del virus del moquillo canino en perros enfermos y su relación con la eficacia del tratamiento antiviral con AgNPs.

3.3.2 Objetivos específicos

1.- Diagnosticar a pacientes que sean sospechosos a la enfermedad del moquillo canino.

2.- Determinar los genotipos del virus del moquillo canino en pacientes

3.- Relacionar los genotipos del virus del moquillo canino detectados con la eficacia del tratamiento antiviral con AgNPs.

Capítulo 4. Metodología

4.1 Recolección de la historia clínica y muestras de pacientes

Para la colecta de los datos de la historia clínica y las muestras de los pacientes que presentaron signología sugerente a la enfermedad de moquillo canino, se contó con el apoyo de varias clínicas veterinarias ubicadas en la ciudad de Ensenada, Baja California. La historia clínica se obtuvo entrevistando al propietario de cada paciente, además de la valoración hecha por un Médico Veterinario.

Asimismo, el tipo de muestra era obtenida por el Médico Veterinario con base a la **tabla 3**. La historia clínica que se elaboró de cada paciente comprendió los siguientes datos: nombre, sexo, edad, peso, raza, signos que presentó, si fue vacunado y si fue ya diagnosticado con alguna prueba. Una vez teniendo un diagnóstico presuntivo o definitivo de la enfermedad, el propietario del paciente decidío utilizar o no el tratamiento antiviral de AgNPs junto con su tratamiento convencional que varió dependiendo de los signos que presentó cada paciente.

Tabla 3. Tipo de muestra para análisis molecular dependiendo de la fase del moquillo canino.

Fase de la enfermedad	Muestra
Fase temprana de infección (fiebre, letargia, anorexia, contacto con perros enfermos)	Sangre en EDTA 1-3 mL
Fase respiratoria	Hisopo humedecido con solución de cloruro de sodio al 0.9% y colocado en un tubo estéril. Orina 5 mL
Fase nerviosa	Líquido cefalorraquídeo 1 mL Orina 5 mL
Fase digestiva o sistémica	Orina 5 mL Sangre en EDTA 1-3 mL

4.1.1 Recolección de muestras

Las muestras de sangre periférica se colectaron de la vena céfalica, safena o yugular de 1 a 3 mL de sangre dependiendo del tamaño perro, y se transfirieron a un tubo BD Vacutainer® K2 EDTA para su análisis posterior.

Las muestras de orina se obtuvieron por micción espontánea, sonda o cistocentesis. Esta última técnica hace referencia a una punción en la vejiga con una jeringa y se utiliza cuando no es posible obtener la orina por cualquiera de los dos primeros procedimientos.

Las secreciones oculares y nasales se obtuvieron humedeciendo un hisopo con solución salina al 0.9% y colectando la muestra por la parte interna de los párpados o la nariz del paciente.

La extracción del líquido cefalorraquídeo se hizo mediante una punción en el espacio sub-aracnoideo, la cual puede realizarse en la región occipital (cisterna magna) o en la región lumbar (cisterna lumbar). En cada caso la preparación del paciente incluye asepsia y antisepsia de la zona donde se realiza la punción y una medicación anestésica, que se adapta a las condiciones individuales de cada paciente.

4.2 Aislamiento del ARN viral

La extracción del ARN viral se realizó mediante dos protocolos diferentes dependiendo del origen de la muestra. Para las muestras de sangre, suero, plasma y la vacuna novibac puppy DP (cepa Onderstepoort) del laboratorio MSD, se utilizó el protocolo descrito para la extracción de ARN mediante TRI Reagent BD de la marca Sigma (Cat. T3809-100ML). En el segundo protocolo para el aislamiento de ARN de las muestras de orina, secreción óculo-nasal y líquido cefalorraquídeo se utilizó el minikit de ARN/ADN viral PureLink de la marca Invitrogen por Thermo Fisher Scientific (Cat.12280-050).

4.2.1 Protocolo TRI Reagent BD para la extracción de ARN viral de muestras de sangre, suero, plasma y vacuna

Preparación de la muestra: Se agregaron 0.2 mL de sangre o plasma a 0.75 mL de TRI Reagent BD suplementado con 20 µL de 5 N de ácido acético. Para el suero solamente se agregó 0.25 mL de suero a 0.75 mL de TRI Reagent BD y en el caso de la vacuna, se disolvió el liofilizado directamente con 0.75 mL de TRI Reagent BD. En los 3 casos las muestras se mezclaron con vórtex. Para la separación de fases, la muestra se incubó durante 5 minutos a TA (temperatura ambiente, aprox. 24°). Posteriormente se le añadieron 0.2 mL de cloroformo y se agitó por 15 segundos. Se dejó reposar de 2-5 minutos a TA y se centrifugó a 12,000 x *g* por 15 minutos a 4 °C.

Aislamiento del ARN: Primero se realizó la precipitación del ARN, en donde se transfirió la fase acuosa a un tubo nuevo y se añadieron 0.25 mL de isopropanol y 0.25 mL de *high salt join mix*. Esta solución se prepara con 7.05 g de citrato de sodio y 2.1 g de cloruro de sodio en 30 mL de agua libre de RNasas. Una vez mezclados la fase acuosa, el isopropanol y la solución de *high salt join mix*, la reacción se incubó por 10 minutos a TA y se centrifugó a 12,000 x *g* durante 10 minutos a 4 °C. Posteiromente se eliminó el sobrenadante y se lavó el pellet de ARN con 1 ml de etanol al 75%, se mezcló mediante vórtex y se centrifugó a 7,500 x *g* por 5 minutos a 4°C. El pellet de ARN se dejó secar al aire por 30 minutos y, se resuspendió en 30 µL de agua libre de ARNsas obtenida del sistema Direct-Q 5 UV calentando la muestra a 60°C por 15 minutos. Posteriormente se mantuvo en hielo y se evaluó la calidad y cantidad del material genético aislado mediante un NanoDrop 2000c spectrophotometer de Thermo Scientific midiendo la absorción de la muestra a 260 y 280 nm y se almacenóa -80°C hasta su utilización posterior.

4.2.2 Protocolo minikit de ARN/ADN viral PureLink para las muestras de orina, secreción óculo-nasal y líquido cefalorraquídeo

Preparación del lisado: Se mezclaron 200 µL de la muestra biológica con 25 µL (20 mg/ mL) de proteinasa K, 200 µL de buffer de lisis viral y 5.6 µL de acarreador de ARN (incluidos en el kit). La mezcla se agitó vigorosamente por 15 minutos y se incubó a 56°C por 15 minutos para ser centrifugada brevemente por 10 segundos a 10,000 rpm. Posteriormente, se agregaron 250 µL de etanol al 100%, se mezcló con vortex por 15 segundos y el lisado fue incubado por 5 segundos a TA.

Purificación del ARN: El lisado de la muestra biológica, se transfirió a la columna colocada en un tubo de colecta (incluidos en el kit) para ser centrifugada a 6800 x *g* por 1 minuto. El tubo fue descartado y la columna colocada en el tubo de lavado. Para el lavado del ARN se adicionaron 500 µL de buffer de lavado (incluido en el kit) y se centrifugó a 6800 x *g* por un minuto. El líquido fue desechado y la columna se colocó nuevamente en el tubo de lavado. Se agregaron 500 µL de buffer de lavado a la columna, se centrifugó a 6800 x *g* durante 1 minuto y el tubo fue desechado. Se colocó otro tubo limpio de lavado a la columna y se centrifugó a la velocidad máxima por 1 minuto y se desechó el tubo. Se colocó ahora la columna en un tubo de recuperación y se agregaron 20 µL de agua libre de ARNsas (también incluida en el kit) en el centro de la columna, se incubó por un minuto a TA y se centrifugó a 12,000 x *g* por 1 minuto. La muestra se mantuvo en hielo mientras se cuantificaba 260/280 nm en el NanoDrop como se indicó anteriormente y posteriormente fue almacenado a -80°C.

4.3 Reacción de transcripción reversa

El ARN extraído se sometió a una reacción de transcripción reversa (RT) para obtener ADN complementario (ADNc) y usarlo como molde en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Se utilizó la retrotranscriptasa SuperScript III de la marca Invitrogen por Thermo Fisher Scientific (Cat. 18080-044), las concentraciones y volúmenes utilizados para una reacción de 20 µL fueron las siguientes de acuerdo a las instrucciones del proveedor:

Componente	Concentración stock	Concentración final	Volumen (µL)/ tubo
ARN	-	100-200 ng	*n**
Hexámeros aleatorios	50 ng/ µL	2.5 ng	1
dNTPs	10 mM	0.2 mM	1
Agua libre de RNasas	-	-	Hasta completar 13

**n*: dependerá de la concentración del ARN.

Esta mezcla se mantuvo a 65°C por 5 minutos y posteriormente 1 minuto en hielo para después agregar lo siguiente:

Componente	Concentración stock	Concentración final	Volumen (µL)/ tubo
Buffer	5X	1X	4
DTT	0.1 M	0.005 M	1
RNaseOUT	40 U/ µL	2 U	1
SuperScript III RT	200 U/ µL	10	1

La reacción se mezcló por pipeteo y posteriormente se incubó a 25°C por 10 minutos, después a 50°C por 50 minutos y por último a 85°C por 5 minutos en un termociclador modelo MyClicler™ marca BIO-RAD. Una vez terminada la reacción de transcripción inversa, la muestra se almacenó a -20°C.

4.4 Amplificación por PCR de punto final

Para poder llevar a cabo la reacción de PCR de punto final, se realizó una búsqueda bibliográfica para seleccionar los pares de oligonucleótidos para el diagnóstico y genotipificación del virus del moquillo canino y también para verificar los protocolos de reacción de PCR que han sido reportados. Una vez que los pares de oligonucleótidos fueron seleccionados, se analizó *in silico* si éstos hibridaban con la cepa del virus del moquillo canino Onderstepoort, la cual se consideró como control positivo ya que es la cepa presente en las vacunas que se usan en México y en el mundo. Esto permitió conocer el tamaño del producto de la reacción de PCR, como se ejemplifica en la **tabla 4**.

Tabla 4. Oligonucleótidos utilizados para la amplificación de los segmentos de los genes *n, f* y *h* del virus del moquillo canino.

Nombre	Gen	Secuencia	Posición	Tamaño de amplicón	Referencia
Mex3N	N	5´-TCTGAGGCAGATGAGTTCTT-3´	480-499	639 pb	Simon-Martínez et al., 2008
		5´-CCATAGCATAACTCCAGAGC-3´	1100-1119		
Arg1F	F	5´-TCCAGGACATAGCAAGCCAACA-3´	4854-4875	681 pb	Sarute N., et al
		5´-GGTTGATTGGTTCGAGGACTGAA-3´	5513-5535		2013
Chi1Hf-EUA1Hr	H	5´-GTCCTTCTCATCCTACTGG-3´	7199-7210	1422 pb	Salas R. V.2013
		5´-TAGGCAACACCACTAATTTRGACTC-3´	8607-8621		Kapil S., 2008

4.4.1 Metodología para el diagnóstico utilizando el gen *n* del virus del moquillo canino

Para la amplificación del segmento de 639 pb de una región conservada del gen *n* del virus del moquillo canino, se utilizó el par de oligonucleótidos denominado como Mex3N que se muestra en la tabla 2, la polimerasa de ADN utilizada fue la Amplitaq de Applied Biosystems por Thermo Fisher Scientific (Cat. N8080172), las concentraciones y volúmenes utilizados para una reacción de 50 uL de PCR fueron las siguientes:

Reactivo	Concentración Stock	Concentración final	Volumen (µL)/ tubo
Buffer	10x	1X	5
$MgCl_2$	25 mM	1.5 mM	3
dNTPs	10 mM	0.2 mM	1
Oligonucleótido Mex3N sentido	10 µM	0.2 µM	1
Oligonucleótido Mex3N antisentido	10 µM	0.2 µM	1
Amplitaq ADN polimerasa	5 U/ µL	1.25 U/ 50 µL	0.25
Agua destilada esteril	-	-	33.75-36.75
DNA	-	-	2-5

La reacción de PCR se realizó en el termociclador modelo MyClicler™ marca BIO-RAD con el protocolo de ciclado que se especifica a continuación:

Etapa	Temperatura °C	Tiempo	Ciclos
1ª Desnaturalización	94°C	5´	1
Desnaturalización	94°C	30´´	
Hibridación	55°C	30´´	30
Extensión	72°C	1´	
Extensión final	72°C	10´	1

4.4.2 Metodología para genotipificación del virus del moquillo canino utilizando los genes *f* y *h*

Para la amplificación de un segmento de 681 pb de una región del gen *f* y de 1422 pb del gen *h* del virus del moquillo canino, se utilizaron el par de oligonucleótidos de Arg1F y Chi1H, respectivamente, los cuales se muestran en la tabla 2. Para llevar a cabo la reacción de PCR, para la amplificación del fragmento del gen *f*, utilizó la polimerasa de ADN Amplitaq de Applied Biosystems por Thermo Fisher Scientific (Cat. N8080172). Sin embargo, para la amplificación del fragmento del gen *h*, se utilizó la polimerasa ADN Platinum Taq de la marca Invitrogen por Thermo Fisher Scientific (Cat. 10966-026) para evitar errores en

la amplificación debido al tamaño del amplicón. Las concentraciones y volúmenes utilizados para una reacción de 50 µL de PCR para el gen *f* fueron las siguientes:

Reactivo	Concentración Stock	Concentración final	Volumen (µL)/ tubo
Buffer	10x	1X	5
$MgCl_2$	25 mM	1.5 mM	3
dNTPs	10 mM	0.2 mM	1
Oligonucleótido Arg1F sentido	10 µM	0.2 µM	1
Oligonucleótido Arg1F antisentido	10 µM	0.2 µM	1
Amplitaq ADN polimerasa	5 U/ µL	1.25 U/ 50 µL	0.25
Agua destilada esteril	-	-	33.75-36.75
DNA	-	-	2-5

La reacción se realizó de igual forma con el termociclador modelo MyClicler™ marca BIO-RAD con el protocolo de ciclado que se especifica a continuación para el gen *f*:

Etapa	Temperatura °C	Tiempo	Ciclos
1ª Desnaturalización	95°C	3´	1
Desnaturalización	95°C	30´´	
Hibridación	58°C	45´´	30
Extensión	72°C	1´	
Extensión final	72°C	5´	1

Para la amplificación del fragmento del gen *h*, se agregaron las siguientes concentraciones y volúmenes en la reacción de PCR:

Reactivo	Concentración Stock	Concentración final	Volumen (µL)/ tubo
Buffer	10x	1X	5
$MgCl_2$	50 mM	1.5 mM	1.5
dNTPs	10 mM	0.2 mM	1
Oligonucleótido Chi1H Sentido	10 µM	0.2 µM	1
Oligonucleótido Chi1H antisentido	10 µM	0.2 µM	1
Amplitaq ADN polimerasa	2 U/ µL	2 U/ 50 µL	0.2
Agua destilada esteril	-	-	33.75-36.75
DNA	-	-	2-5

El protocolo de la reacción de PCR fue el siguiente en el mismo termociclador que para el gen *n* y *f*:

Etapa	Temperatura °C	Tiempo	Ciclos
1ª Desnaturalización	50°C	5´	1
	95°C	15´	1
Desnaturalización	94°C	30´´	
Hibridación	55°C	30´´	40
Extensión	72°C	2´	
Extensión final	72°C	10´	1

4.5 Electroforesis en gel de agarosa

Para la preparación del gel de agarosa al 1.2%, se pesaron 1.2 mg de Agarosa LE de la marca Golg biotechnology (Cat. A-201-500) por cada 100 mL de buffer TAE 1X (50 mL de TAE 50X contiene: 12.1 g de Tris, 7.5 ml de EDTA 0.2 M pH 8, 2.86 mL de ácido acético y se aforó con agua destilada) se vertió en un matraz Erlenmeyer. Para realizar la electroforesis del gel de agarosa, se añadieron 4 µL de buffer de carga (4 mL de glicerol, 2.4 mL de 1M Tris-HCl pH 6.8, 4 mg de azul de bromofenol y 3.1 mL de H_2O) a las muestras de PCR y se mezclaron bien. El gel de agarosa fue sumergido en la cámara de electroforesis que contenía buffer TAE 1X. Posteriormente, se cargaron las muestras de PCR en los pozos del gel y se corrió el gel de electroforesis a 90 volts durante 45 minutos, dependiendo del nivel de resolución deseado.

4.6 Visualización de los fragmentos de PCR

El gel fue teñido en una solución de bromuro de etidio (0.5 µg/mL) por 10 min y posteriormente se expuso bajo luz UV en un transiluminador modelo SmartView Pro UVCI-1100 de la marca Major Science. Las bandas de ADN fueron fotodocumentas mediante el sistema de fotodocumentación SmartView Pro 1100 Imager system. El tamaño de las muestras de PCR fue comparado con el marcador de peso molecular 1 Kb DNA Ladder de la marca Sigma-Aldrich (Cat. D0428-1VL).

4.7 Purificación de los fragmentos de PCR (amplicones)

Los productos de PCR amplificados fueron purificaron para poder ser secuenciados. Para ellos se utilizó el kit ChargeSwitch®-Pro de la marca Invitrogen por Thermo Fisher Scientific (Cat. CS32050). Se cuantificó el volumen de muestra y se colocó la misma cantidad de buffer de purificación (incluido en el kit), en una relación 1:1. La mezcla se agitó con vórtex y se transfirió a una columna, el cual se centrifugó a 10,000 x *g* durante 1 minuto. Después se desechó el líquido y se agregó en la columna 600 µL de buffer de lavado y volvió a centrifugar a 10,000 x *g* durante 1 minuto, nuevamente se desechó el líquido junto con el tubo colector. Se colocó la columna en un tubo nuevo y se agregaron 50 µL de buffer elución contenido en el kit y se incubó durante 2 minutos. Después se centrifugó nuevamente a 10,000 x *g* por un minuto y el líquido se volvió a colocar en la columna e incubó 2 minutos y se centrifugó a 10,000 x *g* durante 1 minuto, se descartó la columna y se evaluó el líquido en el NanoDrop para después almacenarse a -20°C.

4.8 Secuenciación de ADN

La secuenciación de ADN se realizó utilizando el método de Sanger, los productos de PCR se enviaron a un servicio se secuenciación y para ello, se utilizaron los siguientes oligonucléotidos:

Gen	Oligonucleótido	Tamaño del amplicón
N	5´-TCTGAGGCAGATGAGTTCTT-3´	639 pb
F	5´-TCCAGGACATAGCAAGCCAACA-3´	681 pb
H	5´-GTCCTTCTCATCCTACTGG-3´	1422 pb

4.9 Análisis de las secuencias

En los estudios *in silico* se utilizó la cepa *Onderstepoort* obtenida del Centro Nacional de Información Biotecnológica, (*National Center for Biotechnology Information*, NCBI) con el número de acceso AF305419.

Las secuencias obtenidas de los diferentes ampliciones tanto del gen *n* (diagnóstico), gen *f* y *h* (genotipificación), fueron comparadas mediante un BLAST con las secuencias reportadas enconbase en los

datos del NCBI. Se consideró que una secuencia pertenecía a un genotipo cuando ésta tenía un porcentaje de identidad igual o mayor al 96%. Los alineamientos y comparaciones de las secuencias se realizaron utilizando el método ClustalW y los cladogramas mediante el método estadístico de máxima verosimilitud con substituciones tipo nucleótido y por el modelo Jukes-Cantor, todo esto mediante el programa *Molecular Evolutionary Genetic Analysis* (MEGA-X).

4.10 Tratamiento antiviral de AgNPs

Una vez que los pacientes fueron diagnosticados y se confirmó su infección por el virus del moquillo canino, se les ofreció a sus propietarios el tratamiento antiviral de AgNPs Argovit™, el cual ya se había utilizado años atrás teniendo buenos resultados en pacientes que no presentaban afección en sistema nervioso (Bogdanchikova et al., 2016), cuyas características fisicoquímicas se presentan en la **tabla 5** y algunas de ellas se muestran en la **figura 8**. Una vez que los propietarios aceptaron el tratamiento, se calculó la dosis de AgNPs que serían administradas con base en el peso del paciente. La dosis de AgNPs fue de 1.8 mg/ kg/ 8 horas por vía oral. La administración del tratamiento se realizó por parte de los dueños del paciente, una vez que se cumplieron los 7 días (1 semana) de tratamiento, se citaba al paciente para su valoración con su Médico Veterinario, para determinar si era necesario una semana más de tratamiento y así sucesivamente cada semana hasta que era dado de alta por su Médico Veterinario.

Tabla 5. Características fisicoquímicas de los AgNPs Argovit™

PROPIEDADES	**MEDIA**
Contenido de plata metálica (% en peso)	1.2
Contenido de PVP (% en peso)	18.8
Morfología de la AgNP	Esferoidal
Diámetro promedio de las AgNPs por los datos TEM (nm)	35
Intervalo de tamaño de las AgNPs con datos TEM (nm)	1 a 90
Diámetro hidrodinámico: plata metálica con PVP (nm)	70
Potencial zeta (mV)	- 15
Resonancia de plasmón de superficie	420 nm
Estructura de PVP por FTIR	confirmada

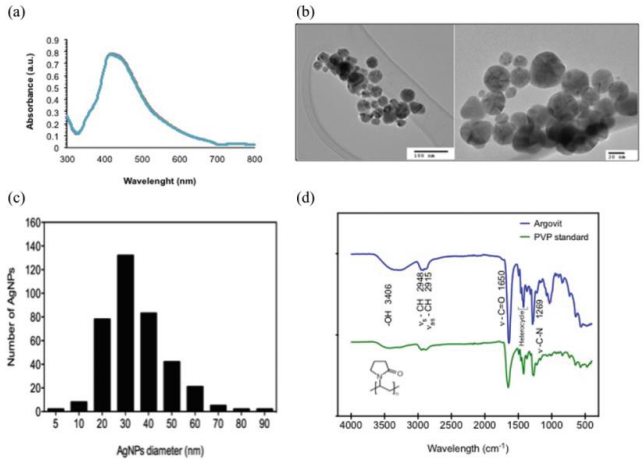


Figura 8. Algunas de las características fisicoquímicas de los AgNPs Argovit™. (a) Espectros UV-Vis de la preparación de AgNPs en agua desionizada, (b) imagen TEM de AgNPs usando diferentes ampliaciones, (c) distribución de tamaño de AgNPs y (d) espectro ATR-FTIR de AgNPs liofilizado Argovit ™ comparado con PVP sólido (Juarez-Moreno, K., et al., 2016).

Capítulo 5. Resultados

5.1 Recolección de la historia clínica y muestras de pacientes

Se recabaron las historias clínicas y las muestras de 44 perros sospechosos y algunos ya diagnosticados con la enfermedad de moquillo canino en 11 diferentes clínicas veterinarias de la ciudad de Ensenada, Baja California en el periodo de marzo de 2017 a mayo de 2018. Algunos de los datos más relevantes y el tipo de muestra de los pacientes, se muestran en la **tabla 6**, el resto de los datos de la historia clínica se encuentran en el **anexo 1**.

Tabla 6. Datos de la historia clínica y el tipo de muestra que se tomó en los pacientes incluidos en el estudio.

PACIENTE	EDAD	SIGNOLOGÍA	DIAGNOSTICADO	MUESTRA
GOLIATH	2 años	Neurológico	No	Suero
ROMINA	6 meses	Neurológico	No	Sangre
JUGUETÓN	8 años	Neurológico	No	Orina
BRUNO	8 años	Neurológico	No	Orina
ELA	2 años	Neurológico	No	Orina
DRAKO	1 año	Neurológico	No	Sangre
CHATA	3 años	Neurológico	No	Sangre
AMAZONA	3 años	Neurológico, digestivo	Sí	Suero
BRADY	18 meses	Neurológico, digestivo	Sí	Suero
SATYN	9 meses	Neurológico, respiratorio	Sí	Sangre
BENITO	5 meses	Neurológico, respiratorio	Sí	Suero
OKI	6 años	Neurológico, respiratorio	Sí	Suero
SBEKA	2 años	Neurológico, respiratorio	Sí	Suero
JENA	3.5 meses	Neurológico, respiratorio	Sí	Sangre
DON	1.4 años	Neurológico, respiratorio, digestivo	Sí	Suero
BICO	8 meses	Neurológico, respiratorio, digestivo	Sí	Sangre
COYOTA	8 años	Neurológico, respiratorio, digestivo	No	Sangre
ALFREDO	11 meses	Neurológico, respiratorio, digestivo	No	Sangre
BAILEY	3 años	Neurológico, respiratorio, dermatológico	No	Orina
LEIKA	7.5 meses	Neurológico, respiratorio, ocular	Sí	Sangre, secreción nasal-ocular
ALISHA	4 meses	Neurológico, respiratorio, ocular	No	Orina

PACIENTE	EDAD	SIGNOLOGÍA	DIAGNOSTICADO	MUESTRA
ROLO	3.5 meses	Neurológico, digestivo, ocular	Sí	Orina
COTY	3 meses	Neurológico, digestivo, ocular	Sí	Sangre, orina y líquido cefalorraquídeo
ROCKO	1.5 años	Neurológico, digestivo, ocular	Sí	Suero
MALUMA	4 meses	Neurológico, dermatológico, ocular	No	Sangre
SLINKI	3 meses	Neurológico, digestivo, ocular, respiratorio	No	Sangre
SURY	4 años	Neurológico, digestivo, ocular, respiratorio	Sí	Sangre
JOSHI	5 meses	Neurológico, digestivo, ocular, respiratorio	Sí	Orina
LOGAN	5 meses	Neurológico, digestivo, ocular, respiratorio	Sí	Orina
HARU	2 años	Neurológico, ocular, respiratorio, dermatológico	Sí	Secreción ocular
LUNAR	2 meses	Neurológico, digestivo, ocular, respiratorio, dermatológico	Sí	Sangre, secreción nasal-ocular
LÁZARO	2 meses	Neurológico, digestivo, ocular, respiratorio, dermatológico	Sí	Sangre, secreción nasal-ocular
MAX	6 meses	Neurológico, digestivo, ocular, respiratorio, dermatológico	Sí	Sangre
NIKY	8 años	Digestivo	Sí	Plasma
HUNTER	3 meses	Digestivo	Sí	Orina
MACA	5 meses	Digestivo	No	Orina
ANASTASIA	1 año	Respiratorio	No	Suero
CHINGADERA	4 meses	Respiratorio	Sí	Orina
SYRA	6 años	Respiratorio	No	Sangre
JACK	3 meses	Ocular	No	Sangre
CABO	3 meses	Digestivo, respiratorio, ocular	No	Sangre, secreción nasal-ocular
LOBO	6 meses	Digestivo, Respiratorio, ocular	Sí	Orina, sangre
MASSON	6 meses	Digestivo, Respiratorio, ocular	No	Orina, sangre
MANCHAS	5 meses	Digestivo, Respiratorio, ocular, dermatológico	No	Orina

5.2 Oligonucleótidos seleccionados para la reacción de PCR

Los pares de oligonucleótidos para la realización de los PCRs, se seleccionaron con base a la bibliografía consultada. El primer grupo de pares de oligonucleótidos, se utilizaron para la detección o diagnóstico y un segundo grupo de oligonucléotidos se usó para la genotipificación del virus del moquillo canino. Los primeros producen un producto de PCR del gen *n*, dicho gen, no presenta mucha variación genética y, por

lo tanto, es el que se utiliza para diagnosticar la enfermedad del virus del moquillo canino. Una vez que los pacientes resultaron positivos a la enfermedad, se procedió a realizar la genotipificación del virus con el segundo grupo de oligonucléotidos. Para ello se seleccionaron los genes *f* y *h* del virus, pues en estos existe una mayor variación genética, además de que ya se ha reportado su uso para fines de genotipificación principalmente del gen *h*, donde se han descrito la mayoría de las cepas circulantes en el mundo con base a su análisis filogenético (Panzera et al., 2014; Sarute et al., 2014; Espinalet al., 2014; Nguyen et al., 2017).

Por lo tanto, en este trabajo, los pares de oligonucleótidos fueron nombrados con base al país donde se utilizaron y al gen que se va a amplificar.

5.2.1 Oligonucleótidos para detección o diagnóstico del virus del moquillo canino

Para la detección del virus del moquillo canino inicialmente fueron seleccionados 3 pares de oligonucleótidos, los cuales han sido utilizados en estudios hechos en Mexico, pero que resultan en un tamaño diferente de amplicón. En la **tabla 7** se muestran dichos pares de oligonucléotidos y el tamaño del amplicón resultante en un estudio *in silico* con la cepa *Onderstepoort,* la cual pertenece al genotipo de America 1, fue aislada en los Estados Unidos de América y es la cepa vacunal que más se comercializa en todo el mundo. En la **figura 9** se puede observar en que parte del gen *n* se unirían cada par de oligonucleótidos.

Tabla 7. Oligonucleótidos utilizados para la detección del virus del moquillo canino y el tamaño del producto de PCR resultante utilizando como control positivo la cepa *Onderstepoort*.

Nombre	Secuencia	País	Gen	Tamaño de amplicón	Referencia
México 1 N (Mex1N)	5'-GTAGACGAAGGGTCGAAAG-3' 5'-GAATCGCCTCAAAGATAGG-3'	México	*n*	296 pb	Gámiz C., et al., 2011
México 2 N (Mex2N)	5´-GCATTGAAACTATGTATCCGGC-3´ 5´-TGCCCGAGTCTGAAGTAAGCT-3´	México	*n*	270 pb	Pedraza B. J. 2011
México 3 N (Mex3N)	5´-TCTGAGGCAGATGAGTTCTT-3´ 5´-CCATAGCATAACTCCAGAGC-3´	México	*n*	639 pb	Simon-Martínez et al., 2008

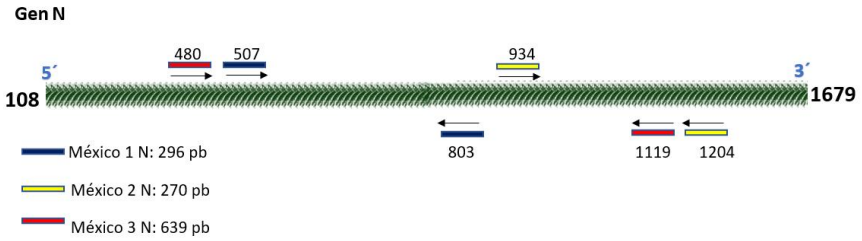


Figura 9. En la cepa *Onderstepoort* el gen *n* del virus del moquillo canino comienza en el nucleótido 108 y termina en el 1679, se observa en este esquema el sitio donde se une cada par de oligonucleótido y el tamaño de amplicón que produce.

Una vez seleccionados los oligonucleótidos para diagnóstico, se utilizó el ADNc de la vacuna contra la cepa del virus del moquillo *Onderstepoort,* para determinar si los tres pares de oligonucleótidos, presentados en la **tabla 7**, hibridaban con la cepa vacunal. Los resultados del producto de PCR resultante se muestran en la **figura 10**. Sin embargo, se decidió utilizar solamente el par Mex3N para el diagnóstico en los pacientes, debido a que se visualizó mejor que los otros 2 pares y es de mayor tamaño (639 pb).

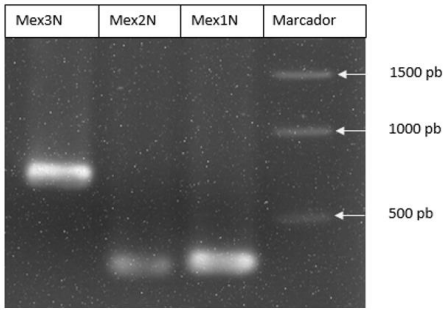


Figura 10. Productos de la reacción de PCR obtenidos con el control positivo (*Onderstepoort)* y los diferentes pares de oligonucleótidos para el gen *n*. Carril 1: Control positivo con Mex3N (639 pb), Carril 2: Control positivo con Mex2N (270 pb), Carril 3: control positivo con Mex1N (296 pb), Carril 4: Marcador de peso molecular 1 Kb DNA Ladder de la marca Sigma-Aldrich.

5.2.1 Oligonucleótidos para genotipificación del virus del moquillo

Los oligonucleótidos seleccionados para la genotipificación, hibridan en regiones específicas del gen *f* y del gen *h*. Para el gen *f* solamente se seleccionó un par, debido a que el fragmento amplificado es en donde se presenta la mayor variación genética de acuerdo a los estudios realizados y por lo tanto no es necesario amplificar otra parte de dicho gen.

Caso contrario al gen *h*, en donde se seleccionaron 4 pares de oligonucleótidos, ya que dicho gen presenta variación genética en toda su extensión, dichos oligonucleótidos han sido reportados en otros estudios en distintos países, pero solamente uno de ellos se realizó en México. Al igual que los pares de oligonucleótidos para el diagnóstico, esto fueron analizados *in silico* con la cepa *Onderstepoort* para determinar el tamaño de los amplicones que se produjeron, los cuales se muestran en la **tabla 8** y se representan en la **figura 11**.

Tabla 8. Oligonucleótidos utilizados para la genotipificación del virus del moquillo canino, utilizando como control positivo la cepa Onderstepoort, determinando el tamaño del producto de PCR que se produce.

Nombre	Secuencia	País	Gen	Tamaño de amplicón	Referencia
Argentina 1 F (Arg1F)	5´-TCCAGGACATAGCAAGCCAACA-3´ 5´-GGTTGATTGGTTCGAGGACTGAA-3´	Argentina	*f*	681 pb	Sarute N., et al 2013
México 1 H (Mex1H)	5'-TGGTTCACAAGATGGTATTC-3' 5'-CAACACCACTAAATTGGACT-3'	México	*h*	612 pb	Gámiz C., et al., 2011
Chile 1 H (Chi1H)	5´-GTCCTTCTCATCCTACTGG-3´ 5´-ACACTCCGTCTGAGATAGC-3´	Chile	*h*	561 pb	Salas R. V.2013
EUA 1 H (EUA1H)	5´-GAATTCGACTTCCGCGATCTCC-3´ 5´-TAGGCAACACCACTAATTTRGACTC-3´	EUA	*h*	1155 pb	Kapil S., 2008
Austria 1 F y H (Aus1FyH)	5'-ACGCTACCAACAGACACTCA-3' 5 '-GAGCGGTGTCAAGACATCTA-3'	Austria	*f* y *h*	536 pb	Benetka V., 2011

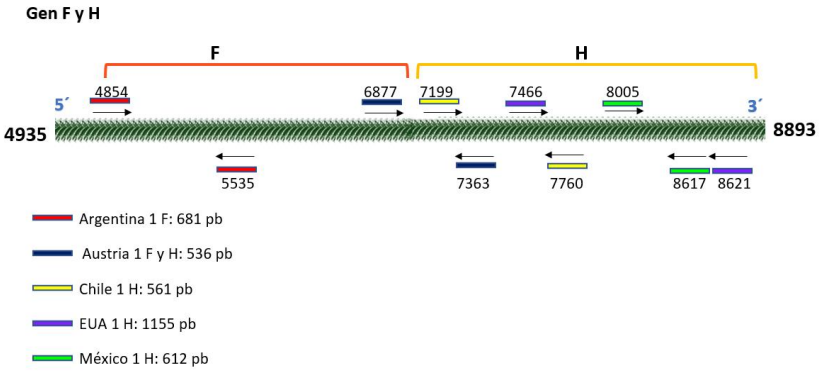


Figura 11. En el virus del moquillo canino los genes *f* y *h* están uno seguido del otro, por lo que el gen *f* en la cepa *Onderstepoort* inicia en el nucleótido 4935 y en el gen *h* termina en el 8893, observándose en donde se une cada para de oligonucleótido y el tamaño de amplicón que produce.

Se realizó un PCR con los oligonucleótidos de genotipificación de los genes *f* y *h*, utilizando como control positivo el ADNc de la vacuna con la cepa *Onderstepoort,* como se muestra en la **figura 12**, todos los pares de oligonucléotidos amplificaron los fragmentos de los tamaños esperados tal como se mencionó en la **tabla 8**. Debido a que los oligonucleótidos utilizados para amplificar el gen *h* fueron demasiados, se optó por combinar algunos de ellos para abarcar la totalidad del gen *h*, y de esta manera utilizar solamente un par, por lo que se evaluó la combinación de Chi1H sentido con EUA1H antisentido, produciéndose así un amplicón de 1422 pb y abarcando casi por completo la longitud del gen *h*. Dicha combinación de oligonucléotidos amplificó el fragmento esperado, como se observa en la **figura 13** y se representa en la **figura 14**, para futuras referencias, a este par de oligonucléotidos de genotipificación del gen *h* se le denominó Chi1Hf-EUA1Hr.

En resumen, como se observa en la **tabla 4** que viene en el apartado de metodología, los 3 pares de oligonucleótidos utilizados para los 3 genes en este estudio fueron Mex3N, Arg1F y Chi1Hf-EUA1Hr.

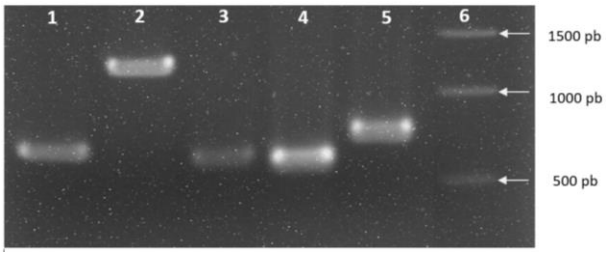


Figura 12. Productos de PCR del control positivo y los diferentes pares de oligonucleótidos para genotipificación de los genes *f* y *h*. Carril 1: Control positivo con Mex1H (612 pb), Carril 2: Control positivo con EUA1H (1155 pb), Carril 3: control positivo con Chi1H (561 pb), Carril 4: Aus1FyH (536 pb), Carrril 5: control positivo con Arg1F (681 pb), Carril 6: Marcador de peso molecular 1 Kb DNA Ladder de la marca Sigma-Aldrich.

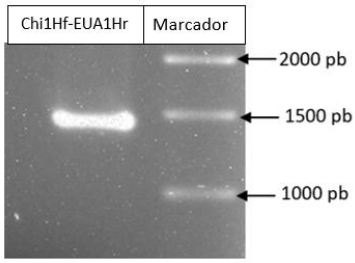


Figura 13. Amplicón resultante de la combinación de los oligonucleótidos Chi1H forward con EUA1H reverse que hibridan en el gen *h* del virus del moquillo canino. Se observa en el primer carril el amplicón con el tamaño calculado de 1422 pb y en el otro carril se encuentra el marcador de peso molecular 1 Kb DNA Ladder de la marca Sigma-Aldrich.

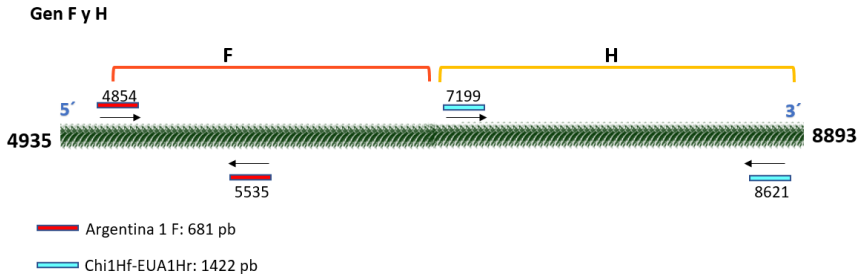


Figura 14. Diagrama de los genes *f* y *h*, en donde se indican el sitio de hibridación de cada par de oligonucleótidos de Argentina 1 F y la combinación de Chile 1 H sentido con EUA 1H antisentido para la genotipificación del virus del moquillo canino, se indica además el tamaño del fragmento de PCR obtenido.

5.3 Amplificación por PCR de punto final

Una vez que los oligonucleótidos fueron seleccionados y probados con el control positivo (cepa vacunal), se decidió realizar los PCR de punto final de las muestras de los pacientes, por lo que se comenzó con la amplificación del gen *n* para el diagnóstico, usando el par de oligonucleótidos Mex3N. Se ideintificaron aquellos pacientes que resultaron positivos y se prosiguió con la amplificación de los genes *f* y *h* con los oligonucleótidos Arg1F y Chi1Hf-EUA1Hr respectivamente, para relizar las pruebas de genotipificación.

5.3.1 Amplificación en el gen *n* para diagnóstico del virus del moquillo

De los 44 pacientes sospechosos y algunos ya diagnosticados, en 12 pacientes amplificó un fragmento del gen *n*, de los cuales 7 de ellos no estaban diagnosticados. En las **figuras 15** y **16** se observa la amplificación del fragmento del gen *n* que fue amplificado utilizando el ADNc sintetizado del ARN viral aislado de las muestras de los 12 pacientes.

Por cuestiones de practicidad a los 12 pacientes se les asigno una letra del abecedario para la identificación en los resultados de las imágenes y su posterior uso en los siguientes apartados

Tabla 9. Letra asignada a cada paciente en los PCR de diagnóstico y genotipificación.

Nombre	Letra asignada	Nombre	Letra asignada
Satyn	Paciente A	Alfredo	Paciente G
Coty	Paciente B	Lázaro	Paciente H
Leika	Paciente C	Haru	Paciente I
Cabo	Paciente D	Goliath	Paciente J
Romina	Paciente E	Jack	Paciente K
Maluma	Paciente F	Ela	Paciente L

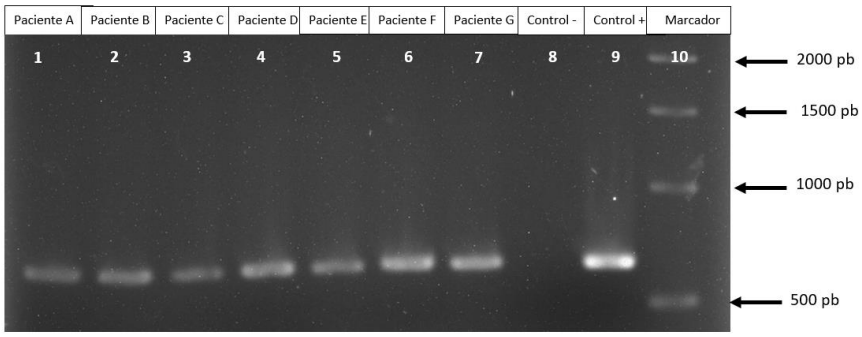


Figura 15. Productos de PCR de pacientes positivos a moquillo canino con el par de oligonucleótidos de Mex3N (639 pb). Carril 1 al 7: Paciente A, B, C, D, E, F y G respectivamente (**Tabla 9**), Carril 8: control negativo, Carril 9: control positivo, Carril 10: marcador de peso molecular 1 Kb DNA Ladder de la marca Sigma-Aldrich.

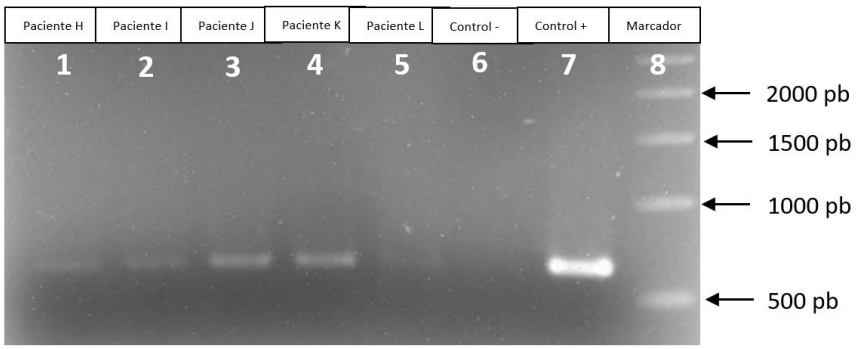


Figura 16. Productos de PCR de pacientes positivos a moquillo canino con el par de oligonucleótidos de Mex3N (639 pb). Carril 1 al 5: Paciente H, I, J, K y L respectivamente (**Tabla 9**), Carril 6: control negativo, Carril 7: control positivo, Carril 8: marcador de peso molecular 1 Kb DNA Ladder de la marca Sigma-Aldrich.

5.3.2 Amplificación en los genes *f* y *h* para genotipificación del virus del moquillo canino

Como se comprobó que en los 12 pacientes que fueron diagnosticados como positivos se logró la amplificación del gen *n*, ahora lo que se pretendió fue la genotipificación de estos virus por lo que se procedió a utilizar el mismo ADNc para la amplificación de los genes *f* y *h* con los oligonucleótidos Arg1F y Chi1Hf-EUA1Hr, en donde solo amplificaron 8 muestras para ambos genes como se observa en las **figuras 17** y **18** en el gen *f*, las **figuras 19** y **20** para el gen *h* y en el **anexo 2** se muestran las figuras de los 4 pacientes que no amplificaron en los genes *f* y *h*.

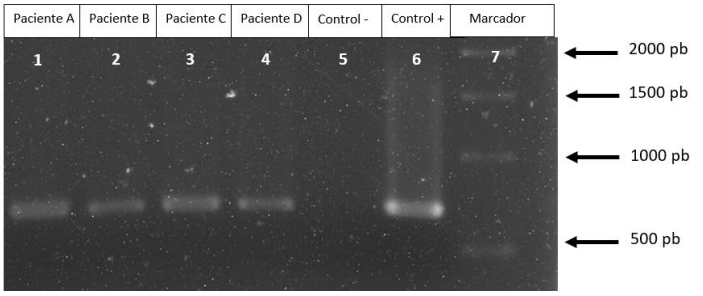


Figura 17. Productos de PCR para genotipificación del virus del moquillo canino con el par de oligonucleótidos de Arg1F (681 pb). Carril 1 al 4: Paciente A, B, C y D respectivamente (**Tabla 9**), Carril 5: control negativo, Carril 6: control positivo, Carril 7: marcador de peso molecular 1 Kb DNA Ladder de la marca Sigma-Aldrich.

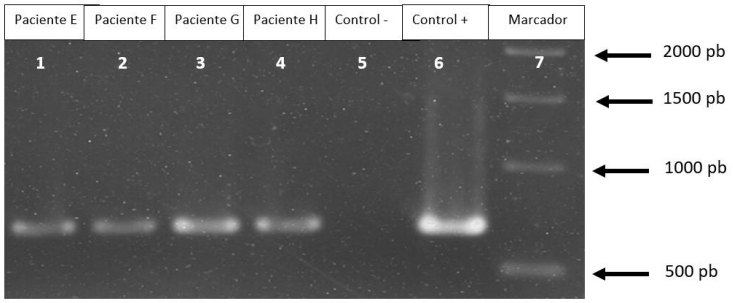


Figura 18. Productos de PCR para genotipificación del virus del moquillo canino con el par de oligonucleótidos de Arg1F (681 pb). Carril 1 al 4: Paciente E, F, G y H respectivamente (**Tabla 9**), Carril 5: control negativo, Carril 6: control positivo, Carril 7: marcador de peso molecular 1 Kb DNA Ladder de la marca Sigma-Aldrich.

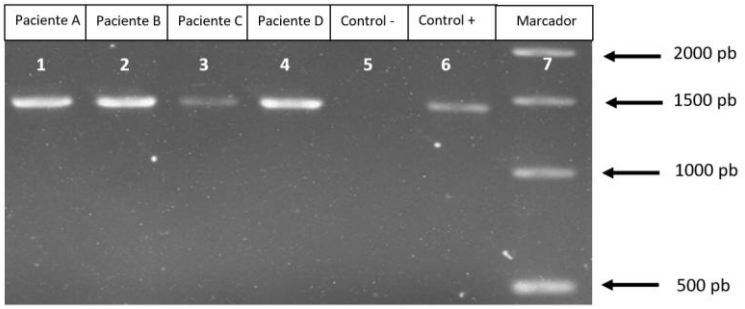


Figura 19. Productos de PCR para genotipificación del virus del moquillo canino con el par de oligonucleótidos de Chi1Hf-EUA1Hr (1422 pb). Carril 1 al 4: Paciente A, B, C y D respectivamente (**Tabla 9**), Carril 5: control negativo, Carril 6: control positivo, Carril 7: marcador de peso molecular 1 Kb DNA Ladder de la marca Sigma-Aldrich.

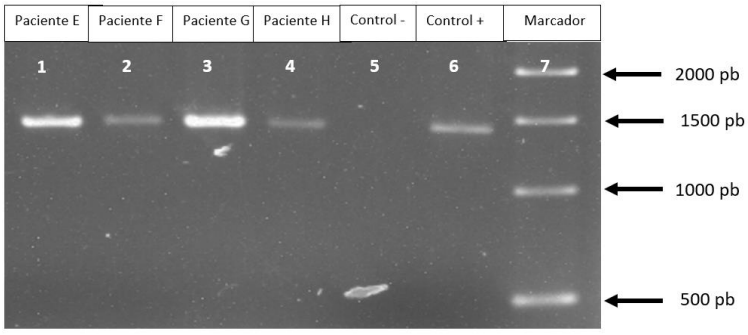


Figura 20. Productos de PCR para genotipificación del virus del moquillo canino con el par de oligonucleótidos de Chi1Hf-EUA1Hr (1422 pb). Carril 1 al 4: Paciente E, F, G y H respectivamente (**Tabla 9**), Carril 5: control negativo, Carril 6: control positivo, Carril 7: marcador de peso molecular 1 Kb DNA Ladder de la marca Sigma-Aldrich.

5.4 Pacientes que recibieron tratamiento antiviral de AgNPs y pacientes que resultaron positivos para el PCR de los genes *n* (diagnóstico), *f* y *h* (genotipificación).

Es importante destacar que, en este estudio no todos los pacientes que fueron diagnosticados mediante RT-PCR recibieron el tratamiento con AgNPs como se observa en la **tabla 10**.

Por ejemplo, de los 12 pacientes diagnosticados, sólo 8 recibieron el tratamiento de AgNPs, de los cuales solamente 2 sobrevivieron (D Y K) y no presentaron signología nerviosa, los 6 pacientes restantes fallecieron y presentaron signología nerviosa.

Asimismo, de los 12 pacientes diagnosticados, 8 de ellos amplificaron para los genes *f* y *h*, no siendo los mismos 8 pacientes que recibieron el tratamiento con AgNPs que se mencionaron anteriormente, ya que uno de los pacientes que amplificó para los genes *f* y *h* no recibió dicho tratamiento y uno de los pacientes que sí recibió las AgNPs no amplificó para los genes *f* y *h*, motivo por el que quedan 8 pacientes cada apartado.

Del total de pacientes que fueron diagnosticados en este trabajo (20 pacientes), ya sea por PCR o otra prueba clínica (ELISA o inmunofluorescencia) y que fueron tratados con AgNPs un 55% sobrevivió (**Anexo 1**). Sin embargo, aquellos pacientes que fueron diagnosticados exclusivamente mediante PCR y fueron tratados con AgNPs solamente sobrevivió el 25% y el 75% de los pacientes falleció (**Tabla 10**).

Tabla 10. Resultados de los PCR de diagnóstico, genotipificación y sobrevivencia de los pacientes que recibieron o no tratamiento con AgNPs.

PACIENTE	TRATAMIENTO CON AgNPs	FALLECIÓ	PCR DIAGNÓSTICO	PCR GENOTIPIFICACIÓN	SIGNOLOGÍA NERVIOSA
Satyn (A)	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí
Coty (B)	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí
Leika (C)	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí
Cabo (D)	Sí	No	Sí	Sí	No
Romina (E)	No	ND	Sí	Sí	Sí
Maluma (F)	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí
Alfredo (G)	SÍ	Sí	Sí	Sí	Sí
Lázaro (H)	SÍ	Sí	Sí	Sí	Sí
Haru (I)	Sí	Sí	Sí	No	SÍ
Goliath (J)	No	Sí	Sí	No	Sí
Jack (K)	No	No	Sí	No	No
Ela (L)	No	Sí	Sí	No	Sí

ND: Información no disponible

5.5 Análisis bioinformático

5.5.1 Análisis de secuencias

Los amplicones obtenidos de los tres genes de virus del moquillo canino (gen *n, f* y *h*) de los ocho pacientes diagnosticados se purificaron, cuantificaron y enviaron a secuenciar. Las ocho secuencias de cada gen fueron editadas y corregidas obteniendo un fragmento de 549 nucleótidos y 183 aa para el gen *n* (del nucleótido 566 al 1117), 570 nucleótidos y 190 aa para el gen *f* (del nucleótido 4939 al 5509) y 1014 nuclétidos y 338 aa para el gen *h* (del nucleótido 7242 al 8256. Posteriormente fueron alineadas entre sí y con la cepa vacunal Onderstepoort a nivel nucleotídico y aminoacídico (**Anexo 3, 4 y 5**).

El análisis de las 8 secuencias del gen *n* de cada paciente en comparación con la secuencia del gen *n* de la cepa vacunal, mostró que existían diferencias a nivel de nucléotidos y de aminoácidos (**tabla 11**). En la tabla, es posible observar que el paciente D, presentó solamente un cambio nucleotídico y ningún aminoacídico respecto de la cepa vacunal. Sin embargo, el paciente A fue el que más número de cambios presentó siendo estos 30 nucleotídicos y 2 aminoacídicos.

Tabla 11. Cambios nucleotídicos y aminoacídicos en el gen *n* de las secuencias de los 8 pacientes diagnosticados con el virus del moquillo canino mediante PCR.

PACIENTE	CAMBIOS NUCLEOTÍDICOS	CAMBIOS AMINOACÍDICOS
A	30	2
B	29	2
C	28	2
D	1	0
E	29	1
F	17	1
G	28	1
H	29	2

La comparación de las secuencias del gen *f* de las muestras virales de los 8 pacientes, demostró que existían diferentes números de cambios de nucléotidos y aminoácidos en cada muestra, respecto del mismo gen en la cepa vacunal. En la **tabla 12**, se observa nuevamente que el paciente D es el que menos

cambios presentó, de los cuales 19 fueron en nucléotidos y 13 en aminoácidos. Sin embargo, el paciente con un mayor número de cambios en la secuenica del gen *f* respecto de la cepa vacunal, fue el paciente F, quién presentó 89 cambios nucleotídicos y 48 aminoacídicos.

Tabla 12. Cambios nucleotídicos y aminoacídicos en el gen *f* de las secuencias de los 8 pacientes diagnosticados con el virus del moquillo canino mediante PCR.

PACIENTE	CAMBIOS NUCLEOTÍDICO	CAMBIOS AMINOACÍDICO
A	82	44
B	83	45
C	74	44
D	19	13
E	84	45
F	89	48
G	83	44
H	82	44

En el caso del gen *h*, la secuencia del paciente D al igual que la secuencia para los otros 2 genes fue el que presentó menos cambios nucleotídicos, respecto del control que fue la cepa vacunal. Los cambios nucleotídicos que el paciente D presentó fueron 97 en total, pero respecto a los cambios aminoacídicos es el que más presentó, con un total de 40 como se observa en la **tabla 12**. Mientras que el paciente que más cambios nucleotídicos tuvo fue el paciente F con 109, igual que en el gen *f* y los que menos cambios aminoacídicos tuvieron fueron los pacientes A, B, E y H, todos con 32 cambios a nivel de aminoácidos.

Tabla 13. Cambios nucleotídicos y aminoacídicos en el gen *h* de las secuencias de los 8 pacientes diagnosticados con el virus del moquillo canino mediante PCR.

PACIENTE	CAMBIOS NUCLEOTÍDICOS	CAMBIOS AMINOACÍDICOS
A	107	32
B	108	32
C	106	34
D	97	40
E	103	32
F	109	36
G	108	34
H	107	32

5.5.2 Análisis filogenéticos

Para el análisis filogenético se realizaron tres cladogramas (**anexo 6**, **7** y **8**), uno para las secuencias de cada gen (*n, f* y *h*), en donde se incluyeron las ocho secuencias de los pacientes diagnosticados y secuencias que se han reportado de los diferentes linajes o genotipos circulantes en todo el mundo. En dicho análisis se observó que siete de los pacientes se agrupan con el nuevo genotipo presente en Norteamérica llamado América 3 y donde también se agrupan otras secuencias ya reportadas en México. Las secuencias que no se agruparon en el genotipo de América 3, fueron las del paciente D, las cuales de acuerdo a los cladogramas de los genes *n* y *f*, se agruparon en el genotipo de América 1 y en el cladograma del gen *h*, se agrupó en el genotipo de tipo Rockborn.

5.6 Relación del genotipo viral y la eficacia del tratamiento antiviral con AgNPs.

Una vez analizadas las secuencias y conociendo al genotipo en el que se agruparon cada una de ellas, se puede distinguir una relación entre el genotipo del virus de los pacientes y su respuesta al tratamiento antiviral con AgNPs. Por ejemplo, se observó que los pacientes que se infectaron con el genotipo América 3 y que recibieron el tratamiento de AgNPs, ninguno sobrevivió. Sin embargo, el único paciente que se infectó con el genotipo América 1/tipo Rockborn y que recibió AgNPs sí sobrevivió (**Tabla 14**).

Tabla 14. Relación de los pacientes genotipificados que recibieron el tratamiento de AgNPs y la supervivencia.

PACIENTE	GENOTIPO AISLADO EN F	GENOTIPO AISLADO EN H	RECIBIÓ AgNPS	FALLECIÓ
A	América 3	América 3	Sí	Sí
B	América 3	América 3	Sí	Sí
C	América 3	América 3	Sí	Sí
D	América 1	Rockborn	Sí	No
F	América 3	América 3	Sí	Sí
G	América 3	América 3	Sí	Sí
H	América 3	América 3	Sí	Sí

Capítulo 6. Discusión

6.1 Diagnóstico del moquillo canino

El diagnóstico certero y oportuno de la enfermedad del moquillo canino es un reto, esto se debe a que esta patología presenta una gama amplia de signos clínicos que se asemejan a los de otras enfermedades, pues el virus afecta diferentes sistemas u órganos, por lo que es necesario el uso de pruebas de laboratorio para la confirmación de la enfermedad. Sin embargo, dichas pruebas como el examen histológico, inmunoenzimático (ELISA), seroneutralización y análisis de líquido cefalorraquídeo, pueden arrojar falsos positivos si se realizan post-inmunización vacunal o si hay presencia de anticuerpos maternales. Al mismo tiempo puede haber falsos negativos en las pruebas que detectan anticuerpos, si el paciente presenta inmunosupresión, dificultando aún más el diagnóstico. Es importante señalar que los pacientes son llevados a consulta en muy raras ocasiones en las etapas tempranas de la enfermedad, siendo más frecuente que se atiendan en la clínica cuando el paciente presenta signos muy sugestivos al moquillo, como los mioclonos. Esta signología tiene dos implicaciones: 1) el virus ya está afectando al sistema nervioso, lo cual es muy preocupante porque esta afección se presenta en la fase final de la enfermedad y 2) si son los primeros signos que se presentan se estaría sospechando de una cepa muy virulenta.

Otra prueba para el diagnóstico de esta enfermedad es el RT-PCR, con el cual se puede obtener un resultado más preciso por su alta sensibilidad y especificidad al ser capaz de identificar el material genético del virus presente en las células infectadas (Frisk *et al*., 1999), por esta razón en esta prueba se pueden obtener resultados positivos a diferencia de las pruebas antes mencionadas en donde los falsos negativos son más frecuentes. Sin embargo, esta prueba todavía es muy poco utilizada debido a su elevado costo y a que no cualquier laboratorio la realiza, utilizándose principalmente en estudios de vigilancia epidemiológica y caracterización genética en diversos países, con el fin de conocer los genotipos circulantes, y recientemente por los brotes que se han estado presentado en animales vacunados (Blixenkrone-Moller *et al*., 1993; Ek-Kommonenet *et al*., 1997; Haas *et al*., 1997; Iwatsuki y col., 2000; Summers and Appel, 1994; Uema *et al*., 2005), creando una preocupación por conocer el genotipo causal de la enfermedad y la razón del fracaso de la vacuna en estos casos. Independientemente, para la prueba de RT-PCR, se tiene que tomar en cuenta algunas consideraciones para poder obtener un resultado más preciso debido a que el material genético que se está aislando es de un virus de ARN, el cual se puede degradar muy fácilmente si la muestra no se maneja correctamente durante la obtención, conservación, antes, durante y después del aislamiento del ARN del virus. Además, para obtener una muestra biológica

o de tejido del paciente, es importante conocer la fase infecciosa en la que se encuentra el paciente o bien, el sistema que esté siendo afectado por el virus, pues de eso dependerá el tipo de muestra biológica a obtener para aislar el material genético por la gran cantidad de carga viral. Por ejemplo, para las muestras de sangre es recomendable obtenerlas cuando el paciente se encuentre en la fase de viremia o de lo contrario la concentración de ARN viral será baja pudiendo no ser detectado en la prueba (Frisk *et al*, 1999; Gámizet *et al*, 2011). Esto es muy diferente a lo que pasa al utilizar muestras de orina o secreciones conjuntivales, en donde se pueden obtener concentraciones más altas del ARN viral (Frisk *et al.*, 1999; Elia *et al*., 2006; Sarute *et al.*, 2014). Es importante señalar que en la mayoría de las pruebas de laboratorio que se emplean de forma tradicional para el diagnóstico de la infección del virus del moquillo, la muestra biológica que se obtiene es de la sangre periférica, independientemente de la fase infecciosa en la que se encuentre el paciente. Por lo que en lo que respecta a este trabajo, solamente se pudo controlar una parte de las muestras obtenidas de las veterinarias, esto debido a que se utilizaron muestras de otra investigación que fueron almacenadas y en la cual los pacientes habían resultado positivos a la infección del virus del Mouqullo utilizando otro tipo de prueba como la suero-neutralización, en la cual, el paciente podría tener un título alto de anticuerpos (1:320) ocasionando una neutralización del virus y por lo tanto una carga viral circulante en sangre muy baja, lo cual para efectos de este trabajo, pudiera dar lugar a un falso negativo.

Asimismo, como ya se mencionó anteriormente, esta enfermedad presenta signos muy variables y frecuentes como los que se presentan en otras enfermedades comunes (Deem *et al.,* 2000), como traqueobronquitis infecciosa canina en la etapa temprana y otras patologías virales producidas por coronavirus canino o por el virus de la hepatitis canina infecciosa. Por lo tanto, en los pacientes sospechosos que resultaron negativos en el RT-PCR u otra prueba diagnóstica de moquillo canino, se podría decir que el agente causal de la signología presentada en estos pacientes es otro y no el virus del moquillo canino.

Tomando en cuenta las consideraciones anteriores fue que se logró reafirmar el diagnóstico en cinco pacientes ya diagnosticados con otra prueba clínica y se confirmó el diagnóstico en siete pacientes no diagnosticados. De estos doce pacientes diagnosticados en donde se amplificó el gen *n*, solamente en ocho de ellos amplificaron los genes de genotipificación *f* y *h*, esto se puede deber a la poca cantidad de material genético que se pudo aislar de estas muestras y/o porque en estos dos genes se presenta una mayor variación genética, por lo que no se utilizan para el diagnóstico de la enfermedad si no para la genotipificación (Jara, 2011), contrario a lo que pasa con el gen *n* que es más conservado y por lo tanto se utiliza para diagnosticar el moquillo canino.

6.2 Genotipos del virus del moquillo canino

Los estudios filogenéticos del virus del moquillo canino en todo el mundo y la asignación de los nombres de los diferentes genotipos dependiendo de la región geográfica en donde se han aislado, se han basado principalmente en la variación genética que presenta el gen *h* y muy recientemente en el gen *f*. En México ya se han reportado secuencias, pero solamente de los genes *n* (diagnóstico) y *h* (genotipificación) del virus del moquillo canino, por lo que una de las mayores aportaciones de este trabajo de tesis, es que es el primero en analizar secuencias del gen *f* para la genotipificación de dicho virus.

A pesar de que el gen *n* es muy conservado, este llega a presentar algunas pequeñas variaciones y es por esto que también se secuenciaron los amplicones del gen *n* de los ocho pacientes diagnosticados, pues en México ya se han reportado algunas secuencias de este gen y por lo tanto sería fácil su comparación. Las secuencias del gen *n* de 7 de los 8 pacientes diagnosticados, se agruparon en el mismo genotipo usando los genes *f* y *h* (**Anexo 6**). Y en el caso del paciente D solamente coincidieron en los agrupamientos de los genes *n* y *f*.

Cada vez hay más estudios de genotipificación del virus del moquillo canino en el mundo y se puede observar que, aunque solamente haya un serotipo reportado de este virus, el número de genotipos o linajes con diferentes virulencias van en aumento y lo que es sorprendente, el número nuevos hospederos incrementa cada vez más, repercutiendo así en el control de la enfermedad por medio de la vacunación. En el caso de México que se encuentra en la región de Norteamérica, en la cual se han aislado virus tanto de animales domésticos como de animales salvajes, se han asignado cuatro genotipos: dos de ellos, América 1 y América 2 que tienen ya tiempo de haberse identificado; en cambio los otros dos son nuevos genotipos, América 3 y América 4 que recientemente han sido aislados y clasificados (Gámiz *et al*., 2011; Wilkes *et al*., 2014; Riley and Wilkes 2015; Pope *et al*., 2016; Wostenberg *et al*., 2018). En este trabajo, de las 8 muestras que fueron genotipificadas, en siete pacientes se aisló el genotipo de América 3. Esto resulta importante, pues justamente en este genotipo, actualmente no hay muchas secuencias reportadas, solamente existe una secuencia para el gen *f*, sin embargo, para el gen *h*, sí se han reportado más secuencias como se observan en los cladogramas de los **Anexos 7 y 8**.

Existen más genotipos aislados en otras partes del mundo que se ha reportado no pertenecer a la región de Norteamérica, como es el caso del genotipo tipo Ártico (*Artic-like*) (Pardo et al. 2005), lo interesante de este trabajo de tesis, es que se logró aislar en la muestra de un paciente el genotipo Rockborn (Rockborn-like) en el gen *h*, pero en la secuencia del gen *f* en el mismo paciente, encaja en el grupo del genotipo de

América 1, esto se puede deberse a que todavía no hay muchas secuencias del gen *f* como ya se mencionó anteriormente, en este caso solo se encontró una secuencia completa aislada en un perro y otra secuencia parcial de la cepa vacunal que lleva el mismo nombre de este genotipo (**Anexo 7**), por lo tanto se dispone de información limitada del genotipo Rockborn en lo que respecta al gen *f* y *n*. Por lo que sería interesante en trabajos futuros, contar con un número mayor de muestras para corroborar si en la Ciudad de Ensenada, existe una incidencia del genotipo Rockborn.

La cepa vacunal Rockborn no pertenece al genotipo América 1 como el resto de las cepas vacunales. De hecho, esta vacuna se sacó del mercado porque se sospechó que esta cepa presentaba virulencia residual después de que hubo varios informes sobre pacientes enfermos relacionados con la vacuna (Haig, 1956; Harley, 1974; Bestetti *et al.,* 1978; Krakowka *et al.,* 1982; Cornwell *et al.,* 1988; McCandlish *et al.,* 1992; Gloyd *et al*., 1995). Sin embargo, se sabe que la vacuna sigue en el mercado y que se han aislado virus de campo del moquillo canino de carnívoros domésticos y silvestres en donde exhiben identidades de nucleótidos superiores al 99% con la cepa Rockborn (Martella *et al*., 2011). Por lo tanto, estos virus son considerados parecidos a Rockborn (Rockborn-like) y es por esto que surgió este genotipo. En el caso de nuestro trabajo, el paciente del cual se identificó este genotipo, sí fue vacunado antes de presentar la enfermedad, pero no con esta cepa vacunal, si no con la cepa Lederle (perteneciente al genotipo de América 1). Actualmente se ha comprobado que es muy poco probable que haya una virulencia residual vacunal, si no que se sospecha de virus análogos que hay en algunos nichos ecológicos y que los pacientes se pueden llegar a infectar antes o después de la vacunación (Martella *et al*., 2011). En el caso de este paciente, cachorro, sí estuvo expuesto a otros perros y animales después de la vacunación, ya que los propietarios comentan que en varias ocasiones lo llevaron a un rancho, pudiéndose sospechar la mezcla de los materiales genéticos del virus de campo y la cepa vacunal, sin embargo esto no es claro y por lo tanto sería indispensable esperar a obtener una nueva serie de pacientes infectados y verificar si existen más secuencias del genotipo Rockborn en los genes *n* y *f* y poderlas comparar.

6.3 Relación del genotipo viral del moquillo canino y la eficacia del tratamiento con AgNPs.

Si bien se ha visto que el tratamiento de AgNPs presenta buenos resultados en pacientes que no presentan signología nerviosa (Bogdanchikova *et al*., 2016), se tiene la sospecha de que la eficacia del tratamiento

antiviral con AgNPs para este grupo perros podría estar relacionado con el genotipo del virus. Esto se debe a que existen cepas del virus que presenta mayor virulencia y afectan casi de forma directa al sistema nervioso, además de que en algunas temporadas se llegó presentar una mejor respuesta en los pacientes que presentaban signología nerviosa sospechando que era otro genotipo infectante. Es por esto que, para tener un panorama más claro, es indispensable conocer más de cerca el agente causal de esta enfermedad y ver si las diferencias o similitudes entre los genotipos que se encuentran en la ciudad de Ensenada están relacionadas con la eficacia del tratamiento de AgNPs.

En los resultados obtenidos se logró diferenciar que pacientes en que los se aisló el genotipo de América 3 no funcionó el tratamiento con AgNPs, en comparación con el paciente en donde se aisló el genotipo América 1/ tipo Rockborn que sobrevivió a dicha enfermedad. Al igual que esta diferencia presentada, también cabe destacar que los pacientes infectados con el genotipo América 3 presentaron signología nerviosa y el paciente infectado con el virus de América 1/ tipo Rockborn no presentó signología nerviosa. En el estudio de Bogdanchikova y colaboradores, se reportó que el tratamiento antiviral con AgNPs era efectivo únicamente en los pacientes con signología no-nerviosa, y en aquellos perros infectados con signología nerviosa el tratamiento no fue eficaz y los perros fallecieron. Eso da la pauta para indagar qué diferencias existen entre los virus que afectan a los perros con signología no-nerviosa y aquellos que ocasionan afecciones nerviosas.

Se ha demostrado que la N-glicosilación es importante para el correcto plegamiento, transporte y función de las glicoproteínas F y H de otros paramixovirus (Ng *et al.,* 1990; Hu *et al.,* 1994; McGinnes *et al.,* 2001; Segawa *et al.,* 2003) y que los aa de cisteína son un importante factor para los enlaces de disulfuro y la estructura estérica de las proteínas. La proteína F del nuevo genotipo América 3 presenta 7 N-glicosilaciones y 17 cisteínas, mientras que el genotipo América 1 solamente presenta 4 N-glicosilaciones y 16 cisteínas. En el caso de la proteína H, el genotipo América 3 y el genotipo tipo Rockborn presentan 8 N-glicosilaciones y 12 cisteínas. Teniendo esto en cuenta, principalmente en el gen *f*, en donde hay diferencias entre los dos genotipos, estudios previos sugieren que la N-glicosilación de las glicoproteínas virales desempeñan un papel crítico en el ciclo de vida y en los mecanismos de virulencia, tales como la unión a los receptores de la superficie celular y la protección contra la neutralización de anticuerpos (Moeller e*t al.,* 2001; von Messling *et al.,* 2003; Aguilar *et al.,* 2006; *Kim et al.,*2008). Por lo que en las nuevas cepas de campo aisladas en perros vacunados se ha visto que estas presentan un mayor número de N-glicosilaciones en comparación con la cepa vacunal Onderstepoort, la cual solo presenta 4 en cada gen (*f* y *h*), lo que sugiere que entre mayor es el número de N-glicosilaciones mayor es la virulencia del

virus, además de que se ha reportado que tales virus pueden desencadenar reacciones inmunosupresoras (Pfeuffer *et al.,* 2003).

Los resultados obtenidos sugieren que el genotipo de América 3 es más virulento y pudiera llegar a inmunosuprimir a los pacientes, ya que como también se pudo observar en el estudio de Bogdanchikova y colaboradores en el 2016, los pacientes que no sobrevivieron además de presentar signología nerviosa presentaban niveles bajos de anticuerpos, en comparación con los pacientes que sobrevivieron con la ayuda del tratamiento de AgNPs.

Existen reportes que sugieren que la actividad antiviral de las AgNPs, se da principalmente por la interacción de las AgNPs con los enlaces disulfuro de las proteínas virales, interaccionando con los grupos grupos sulfhidrilos, ocasionando la desnaturalización de las proteínas al reducir los puentes disulfuro tal como sucede con los iones de plata y como se demostró en el virus del VIH, en donde las AgNPs se unen a la glicoproteína 120, la cual presenta estos puentes disulfuro en los sitios donde se lleva la interacción con los CD4, impidiendo así su infección (Elechiguerra *et al.,* 2005; Lara *et al.,* 2010). Por lo tanto, es posible que las AgNPs se unan a las glicoproteínas F y H del virus del moquillo canino. Sin embargo, por las diferentes características de virulencia e inmunosupresión que presenta cada genotipo del virus y que están relacionadas a la presencia de un mayor número de N-glicosilaciones y cisteínas, es factible que las AgNPs puedan desestabilizar las proteínas virales como la glicoproteína F, que sean menos estables en su conformación y por lo tanto que contengan un menor número de cisteínas, enlaces disulfuro y N-glicosilaciones.

Por lo tanto, como se observa en los resultados, existe una relación entre los genotipos aislados y la eficacia que presentan las AgNPs y esto pudiera deberse a las propiedades bioquímicas de las glicoproteínas virales F y H que presentan los diferentes genotipos identificados. Como se mencionó, se ha reportado que el grado de virulencia de un genotipo está relacionado con la cantidad de N-glicosilaciones y el número de enlaces disulfuro en las glicoproteínas virales F y H. Por ello, conocer el genotipo de los virus del moquillo canino que inciden en la Ciudad de Ensenada Baja California nos permitirá realizar un diagnóstico oportuno de los pacientes y a la vez determinar *a priori* si el tratamiento con AgNPs pudiera ser eficaz en esos pacientes.

Capítulo 7. Conclusiones

1. En este trabajo, se logró diagnosticar pacientes sospechosos al virus del moquillo canino por medio de RT-PCR, técnica poco empleada todavía en las clínicas veterinarias, logrando amplificar un fragmento de un gen (*n*) muy conservado de este virus.

2. Los estudios resportados sobre la genotipificación del virus de moquillo en México son muy escasos, por lo tanto, con este trabajo se aporta mayor información relacionada sobre los genotipos virales que circulan en la región Noroeste del país, ya que la mayoría de los estudios realizados han sido en el centro del país y utilizando el gen *h*.

3. En este trabajo por primera vez se utilizó el gen *f* para genotipificar la muestra de los pacientes diagnosticados con el virus del moquillo canino.

4. Se encontró que la mayoría de las secuencias genotipificadas de los pacientes diagnosticados, pertenecen al genotipo América 3 el cual tiene relativamente muy poco tiempo que se empezó aislar. También se identificó otro genotipo llamado tipo-Rockborn, del cual también existen muy pocas secuencias reportadas en Norteamérica, pues este genotipo no pertenece a esta región.

5. Se determinó que las secuencias del gen *f* en los pacientes infectados con el genotipo viral América 3, presentan un mayor número de N-glicosilaciones y cisteínas comparadas con el genotipo tipo-Rockborn e incluso con el genotipo de la cepa vacunal Onderstepoort, que es de las más usadas en todo el mundo. Se ha reportado en estudios previos de este virus, que un mayor número de N-glicosilaciones está relacionado con una mayor virulencia e inmunosupresión pudiendo afectar directamente al sistema nervioso, es por esto que los pacientes con el genotipo de América 3 presentaron signología nerviosa y no se recuperaron aún con el tratatamiento de AgNPs, en contraste con el paciente con el genotipo tipo-Rockborn/ América 1 que no presentó signología nerviosa y se recuperó sin secuelas con la ayuda de las AgNPs.

6. Es posible sugerir que la eficacia del tratamiento antiviral con AgNPs, depende del genotipo viral, pero, sobre todo, de la cantidad de N-glicosilaciones, número de cisteínas y enlaces disulfuro, lo que las hace ser menos estables y por lo tanto faciltar la desestabilización de las proteínas virales mediante la unión de las AgNPs con las proteínas virales pricipalmente la glicoproteína F.

7. Con este estudio, es posible determinar que aquellos pacientes infectados con el genotipo tipo-Rockborn, tienen una mayor probabilidad de responder de manera favorable al tratamiento antiviral con AgNPs, no así en el caso de los pacientes infectados con el genotipo de America 3, quienes tienen escasas probabilidades de sobrevivir a la enfermedad del moquillo canino.

Literatura citada

Aguilar, H. C., Matreyek, K. A., Filone, C. M., Hashimi, S. T., Levroney, E. L., Negrete, O. A., Bertolotti-Ciarlet, A., Choi, D. Y., McHardy, I, Fulcher, J. A., Su, S. V., Wolf, M. C., Kohatsu, L., Baum, L. G., Lee, B. 2006. N-glycans on Nipah virus fusion protein portect against neutralization but reduce membrane fusion and viral entry. *J Virol*. 80:4878-4889.

Anderson, D. E., von Messling, V. 2008. Region between the canine distemper virus M and F genes modulates virulence by controlling fusion protein expression. *J Virol*. 82, 10510-10522.

Amude, A. M., Alfieri, A. A., Alfieri, A. F. 2007. Clinicopathological findings in dogs with distemper encephalomyelitis presented without characteristic signs of the disease. *Res Vet Sci*. 82(3):416–22.

Appel M. J. G., Summers B. A. 1999. Distemper canino: estado actual. James A. Baker Institute for Animal Health, de http://www.ivis.org/advances/infect_dis_carmichael/appel_es/ivis.pdf

AshaRani, P. V.; Low Kah Mun, G.; Hande, M. P., Valiyaveettil, S. 2009. Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in human cells. *ACS Nano*. 3, 279–290.

Beineke, a., Puff C, Seehusen, F., Baumgärtner, W. 2009. Pathogenesis and immunopathology of systemic and nervous canine distemper. *Vet Immunol Immunopathol*. 127(1–2):1–18.

Beineke, A., Baumgärtner W., Wohlsein, P. 2015. Cross-species transmission of canine distemper virus-an update. 1:49–59.

Bellini, W. J., Englund, G., Richardson, C. D., Rozenblatt, S., Lazzarini, R.A. 1985. Matrix genes of measles virus and canine distemper virus: cloning, nucleotide sequences, and deduced amino acid sequences. *J. Virol*. 58, 408-416.

Benetka, V., Leschnik, M., Affenzeller, N., Möstl, K. 2014. Phylogenetic analysis of Austrian canine distemper virus strains from clinical samples from dogs and wild carnivores. Veterinary Record. doi: 10.1136/vr.c6404

Berríos, P., Durán, C. 2005. Principales enfermedades virales de los caninos. Situación en Chile. Monografías Electrónicas de Patología Veterinaria 2: 68-93.

Bestetti, G., Fatzer, R., Frankhauser, R. 1978. Encephalitis following vaccination against distemper and infectious hepatitis in the dog. An optical and ultrastructural study. Acta Neuropathol. 43:69-75.

Blixenkrone-Moller, M., Svansson, V., Have, P., Orvell, C., Appel, M., Pedersen, I. R., Dietz, H., Henriksen, P. 1993. Studies on manifestations of canine distemper virus

Bogdanchikova, N., Vázquez-Muñoz, R., Huerta-Saquero, A., Pena-Jasso, A., Aguilar-Uzcanga, G., Picos-Díaz, P. L. 2016. Silver nanoparticles composition for treatment of distemper in dogs. *International Journal of Nanotechnology.* 13(1–3), 227–237.

Borrego, B., Lorenzo, G., Mota-Morales, J. D., Almanza-Reyes, H., Mateos, F., López-Gil, E., … Bogdanchikova, N. 2016. Potential application of silver nanoparticles to control the infectivity of Rift Valley fever virus in vitro and in vivo. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine, 12(5), 1185–1192. https://doi.org/10.1016/j.nano.2016.01.021.

Brooks G. F., Carroll K. C., Butel J. S., Morse S. A., Mietzner T. A. 2014. Microbiología médica. (26ª ed) McGraw-Hill Education. De www.accessmedicina.com.

Carvalho, O. V., Botelho, C. V., Ferreira, C. G., Ferreira, H. C., Santos, M. R., Diaz, M. A., Oliveira, T. T., Soares-Martins, J. A., Almeida, M. R., Silva, A. Jr. 2013. In vitro inhibition of canine distemper virus by flavonoids and phenolic acids: implications of structural differences for antiviral design. *Res. Vet. Sci*., Vol. 95, No. 2, pp.717–724.

Cattaneo, R., Kaelin, K., Baczko, K., Billeter, M.A. 1989. Measles virus editing provides an additional cysteine-rich protein. *Cell.* 56, 759-764.

Céspedes, P. F., Cruz, P., & Navarro, C. O. 2010. Modulación de la respuesta inmune durante la infección por virus distemper canino: implicancias terapéuticas y en el desarrollo de vacunas. *Archivos de medicina veterinaria*, *42*(2), 15–28.

Cha, S-Y., Kim, E-J., Kang, M., Jang, S-H., Lee, H-B., Jang, H-K. 2002. Epidemiology of canine distemper virus in wild raccoon dogs (Nyctereutes procyonoides) from South Korea. Comp Immunol Microbiol Infect Dis. 35(5):497–504.

Chappuis, G. 1995. Control of canine distemper. *Veterinary Microbiology*. 44:351-358.

Cocks, B. G, Chang, C-CJ., Carballido, J. M., Yssel, H., De Vries, J. E., Aversa, G. 1995. A novel receptor involved in T-cell activation. Nature.376: 260-263.

Cornwell, H. J. C. 1988. Encephalitis in dogs associated with a batch of Canine Distemper (Rockborn) Vaccine Coreection. Vet Rec. 122:87.

Craig, E. 2000. Enfermedades infecciosas en perros y gatos. 2ª ed. México D.F: McGraw-Hill. Interamericana Editores, S.A. de C.V. 1014 p.

Curran, J., Kolakofsky, D. 2000. Replication of paramyxoviruses. Adv Virus Res.54: 403-422.

Damien, B. C., Martina, B. E. 2002. Prevalence of antibodies against canine distemper virus among red foxes in Luxembour. J Wilds Dis. 38 (4):856-859.

Deem, S., Spelman, L., Yates, R., Montali, R. 2000. Canine Distemper in terrestrial carnivores: a review. J Zoo Wildl Med. 31:441–451.

De Vries, R. D., Paul Duprex, W., De Swart R. 2015. L. Morbillivirus infections: An introduction. Viruses. 7(2):699–706

Elechiguerra, J. L., Burt, J. L., Morones, J. R., Camacho-Bragado, A., Gao, X., Lara, H. H., and Yacaman, M. J. 2005. Interaction of silver nanoparticles with HIV-1. J. *Nanobiotechnology*. 3-6.

Elia, G., Decaro, N., Martella, V., Cirone, F., Lucente, M. S., Lorusso, E., Buonavoglia, C. 2006. Detection of canine distemper virus in dogs by real-time RT-PCR. *Journal of Virological Methods*, *136*(1–2), 171–176. Doi: 10.1016/j.jviromet.2006.05.004

Ek-Kommonen, C., Sihvonen, L., Pekkanen, K., Rikula, U., Nuotio, L. 1997.Oubreak off canine Distemper in vaccinated dogs in Finland. *Vet Rec*. 141, 380-383.

Entenza, J., Vouillamoz, J., Glauser, M. y Moreillon, P., 1997. Levofloxacin versus ciprofloxacin, flucloxacillin, or vancomycin for treatment of experimental endocarditis due to methicillinsusceptible or-resistant Staphylococcus aureus, Antimicrobial Agents and Chemotherapy. (41), 1662-1667.

Espinal, M., Díaz, F., Ruiz, J. 2014. Phylogenetic evidence of a new canine distemper virus lineage among domestic dogs in Colombia, South America. Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad de Antioquia. Medellín, Colombia: *Veterinary Microbiology*. 172: 168–176.

Ettinger, S. J., Feldman, E. C. 2007. Tratado de medicina interna veterinaria. 6ª ed. Madrid: Elseiver España S.A.

Fenner, F., Bachmann, P., Gibbs, E., Murphy, F., Studert, M., White, D. 1992. Virología veterinaria. Zaragoza, España: Ed. Acríbia.

Frisk, A. L, Konig, M., Moritz, A., Baumgartner, W. 1999. Detectionof Canine Distemper VirusNucleoprotein RNA by ReverseTranscription-PCR Using Serum, Whole Blood, and CerebrospinalFluids from Dogs with Distemper.J. Clin. Microbiol. 37: 3634-3643.

Galdiero, S., Falanga, A., Vitiello, M., Cantisani, M., Marra, V., & Galdiero, M. 2011. Silver Nanoparticles as Potential Antiviral Agents. *Molecules*, *16*(12), 8894–8918. https://doi.org/10.3390/molecules16108894

Gámiz, C., Martella, V., Ulloa, R., Fajardo, R., Quijano-Hernandéz, I., Martínez, S. 2011. Identification of a new genotype of canine Distemper virus circulating in America. *Vet Res Commun*. 35: 381-390

Gloyd, J.1995. Vaccines recalled. J Am Vet Med Assoc 1995; 207:1397

Greene, C., Appel, J. G. 1998. Canine distemper. In: Green CE (ed) Infectious diseases of the dog and cat, 2a ed. WB Saunders Co. Philadelphia. p 9–22.

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

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, 169-171

Haig, D. A. 1948. Preliminary note on the cultivation of Green´s Distemperoid virus in fertile hen eggs, Onderstepoort. J Vet Sci. 23:149-55.

Harley, W. J. 1974. A post-vaccinal inclusion body encephalitis in dogs. *Vet Pathol.* 11:301-12

Herrada, A. F., Contreras, N., Marini, C., Amador, P., González, C., Cortés, C., Riedel, C., Carvajal, F., Figueroa, L., Michea, C., Fardella, A., Kalergis. 2010. Aldosterone promotes autoimmune damage by enhancing Th17-mediated immunity. J Immunol 184, 191 -202.

Hu, A., R. Cattaneo, S. Schwartz, and E. Norrby. 1994. Role of N-linked oligosaccharide chains in the processing and antigenicity of measles virus haemagglutinin protein. J. Gen. Virol. 75:1043–1052.

Hussain, S.M., Hess, K.L., Gearhart, J.M., Geiss, K.T., Schlager, J.J. 2005. In vitro toxicity of nanoparticles in BRL 3A rat liver cells. *Toxicol. In Vitro*. 19, 975–983.

Iruretagoyena, M. S., Sepúlveda, J.P., Lezana, M., Hermoso, M., Bronfman, M., Gutiérrez, S., Jacobelli, A., Kalergis. 2006. Inhibition of Nuclear Factor-κB enhances the capacity of immature dendritic cells to induce antigen-specific tolerance in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Pharmacol Exp Ther.* 318, 59-67

Isenberg, H., Alperstein, P. y France, K., 1999. In vitro activity of ciprofloxacin, levofloxacin, and trovafloxacin, alone and in combination with β-lactams, against clinical isolates of Pseudomonas aeruginosa, Stenotrophomonas maltophilia, and Burkholderia cepacia, Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, (33), 81-86.

Iwatsuki, K., Tokiyoshi, S., Hirayama, N., Nakamura, K., Ohashi, K., Wakasa, C., Mikami, T., Kai, C. 2000. Antigenic differences in the H proteins of canine distemper viruses. *Vet. Microbiol*. 71: 281–286.

Jara, C., Matus, P., Moreira, R. 2007. Distemper Canino en Isla Robinson Crusoe (Archipiélago Juan Fernández, V Región): antecedentes de un brote epidémico. Boletín Veterinario Oficial. SAG, Chile 8: 1-19.

Jara, P. 2011. Detección del gen de la hemoaglutinina del Virus Distemper Canino mediante la reacción en cadena de la polimerasa asociada a transcripción inversa. Memoria Título Médico Veterinario. Santiago, Chile. U. Chile, Fac. de Ciencias Veterinarias y Pecuarias. 18 p.

Johnson, R., Glickman L., Emerick T., Patronek G. 1995. Canine distemper infection in pet dogs: I. Surveillance in Indiana during a suspected outbreak. J. Am. Anim. Hosp Assoc 31 (3):223-229.

Juarez-Moreno, K., Mejía-Ruiz, C. H., Díaz, F., Reyna-Verdugo, H., Re, A. D., Vazquez-Felix, E. F., Bogdanchikova, N. 2017. Effect of silver nanoparticles on the metabolic rate, hematological response, and survival of juvenile white shrimp Litopenaeus vannamei. *Chemosphere*, *169*, 716–724. Doi: 10.1016/j.chemosphere.2016.11.054

Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., Tamura K. 2018. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, de https://doi.org/10.1093/molbev/msy096.

Sanjay Kapil, S., Allison, R. W., Johnston, L., Brandy L. Murray, B. L., Holland, S., Jim Meinkoth, J., Johnson, B. 2008. Canine Distemper Virus Strains Circulating among North American Dog. 15 (4) 707–712. doi:10.1128/CVI.00005-08

Salas-Retamal, V. P. 2013. Análisis filogenético del gen de la hemaglutinina del virus distemper canino en perros infectados naturalmente en chile. Tesis de Licenciatura. Universidad de Chile. De: http://repositorio.uchile.cl/handle/2250/131698

Kim, J. M., Yun, S. I., Songs, B. H., Hahn, Y. S., Lee, C. H., Oh H. W., Lee Y. M. 2008. A single N-linked glycosylation site in Japanese encephalitis virus prM protein is critical por cell type-specific prM protein biogenesis, virus particle release, and pathogenicity in mice. *Journal of Virology*. 82:7846-7862.

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

Krakowka, S., Olsen, R.G., Axthelm, M.K., Rice J., Winters, K. 1982. Canine parvovirus infection potentiates canine distemper encephalitis attributable to modified live-virus vaccine. *J Am Vet Med Assoc*. 180.137-9.

Krumm, S. A., Yan, D., Hovingh, ES., Evers, T. J., Enkirch, T., et al. 2014. Orally available small-molecule polymerase inhibitor cures a lethal morbillivirus infection. *Sci Transl Med.* 6:232ra52.

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

Lamb, R., Parks, G., 2007. Paramyxoviridae: The Viruses and Their Replication, in: Fields Virology. Lippincott Williams & Wilkins.

Lappas, M. M., Permezel, G. E. 2003. N-acetyl-cysteine inhibits phospholipid metabolism, proinflammatory cytokine release, protease activity, and Nuclear Factor-κB deoxyribonucleic acid-binding activity in human fetal membranes in vitro. J Clin Endocrinol Metab 88, 1723-1729.

Lara, H. H., Ayala-Nuñez, N. V., Ixtepan-Turrent, L., Rodriguez-Padilla, C. 2010 Mode of antiviral action of silver nanoparticles against HIV-1. *Journal of Nanobiotechnology.* 8:1.

Larson, L., Schultz, R. 2006. Effect of vaccination with recombinant canine Distemper virus vaccine immediately before exposure under shelter-like conditions. *Vet Ther.* 7: 113-118.

Lee, M. S., Tsai, K. J., Chen, C. Y., Liu, Y. P., Chang, C. C., Lee S. H., Hsu, W. L. 2008. The identification of frequent variations in the fusion protein of canine distemper virus. *Vet Journal.* 183, 184-190.

Liermann, H., Harder, T.C., Lochelt, M., von Messling, V., Baumgarther, W., Moennig, V., Hass. L. 1998. Genetic analysis of the central unstranslated genome region and the proximal codding part of the F gene of wild-type and vaccine canine Distemper Morbilliviruses. Virus Genes. 17, 259-270.

Loots A. K., Mitchell E., Dalton D. L., Kotzé A., Venter E. H. 2017. Advances in canine distemper virus pathogenesis research: a wildlife perspective Journal of General Virology. 98:311–321.

Lorenzana L. 2008. Actualización en la terapéutica del Moquillo Canino. Uso del Interferón Recombinante. México: Virbac Al Día Animales de Compañía No II. p 18.

Martella, V., Elia, G., Lucente, M, Decaro, N., Lorussi, E., Banyal, K., Blixenkrone-Møller, M., Lan N., Yamaguchi, R., Cirone, F., Carmichael, L., Bounavoglia, C. 2006. Heterogeneity with the hemagglutinin genes of canine distemper virus strains detected in Italy. *Vet Microbiol*. 116, 301-309.

Martella, V., Elia, G., Buonavoglia, C. 2008. Canine distemper virus. Vet. Clin. North. Am. Small. Anim. Pract. 38: 787–797, vii–viii.

Martella, V., Blixenkrone-Møller, M., Elia, G., Lucente. M. S., Cirone F., Decaro, N., et al.2015. Lights and shades on an historical vaccine canine distemper virus, the Rockborn strain. Vaccine. 29(6):1222–7.

McCandlish, I. A., Cornwell, H. J., Thompson, H., Nash, A. S., Lowe, C. M. 1992. Distemper encephalitis in pups after vaccination of the dam. *Vet Rec.* 130:27-30.

McCarthy, A. J., Shaw, M., Goodman, S. J., B. P. R. 2007. Pathogen evolition and disease emergence in carnivores Pathogen evolution and disease emergence in carnivores. *Proc. R. Soc. B.* 3265-3174.

McGinnes, L., T. Sergel, J. Reittner, and T. Morrison. 2001. Carbohydrate modifications of the NDV fusion protein heptad repeat domains influence maturation and fusion activity. Virology 283:332–342.

McNeil, S. E. 2005. Nanotechnology for the biologist. J.Leukoc.Biol. 78:585-594.

Moeller, K., Duffy, I., Duprex, P., Rima, B., Beschorner, R., Fauser, S., Meyer-mann R., Niewiesk, S., ter Meulen, V., Schneider-Schaulies, J. 2001 Recombinant measles viruses expressing altered hemagglutinin (H) genes: functional separation of mutations determining H antibody escape from neurovirulence. *Journal of Virology.* 75:7612-7620.

Ng, D. T. W., S. W. Hiebert, and R. A. Lamb. 1990. Different roles of individual N-linked oligosaccharide chains in folding, assembly, and transport of the simian virus 5 hemagglutinin-neuraminidase. Mol. Cell. Biol. 10:1989–2001.

Moreira R, Stutzin M. 2005. Estudio de la Mortalidad de Zorros en la IV Región, Boletín Veterinario Oficial. 3: 1-8.

Navarrete, D. 2008. Prevención y Tratamiento del Distemper Canino. Tesis de Médico Veterinario y Zootecnista. México: Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. p 42-44.

Nelson, R. W., Couto. C. G. 2000. Medicina interna de animales pequeños. 2a ed. Argentina: Editorial Inter-Medica. p 329, 949-952, 1021,1079-1080,1173-1376.

Noh, K. H., Lim, S-K., Moon, J. S., Kang, W. J., Lee, D., Lee, Y-I., Hwang. 2005. Mega-dose Vitamin C modulates T cell functions in Balb/c mice only when administered during T cell activation. Immunol Lett 98, 63-72.

Olson, P., Finnsdüttir, H., Klingeborn, B, Hedhammer, M. 1996. Duration of antibodies elicited by canine distemper virus vaccinations in dogs. Veterinary Record. 141:654-655.

Orlando, E.; Imbschweiler, I.; Gerhauser, I.; Baumgärtner, W.; Wewetzer, K. 2008. In vitro characterization and preferential infection by canine distemper virus of glial precursors with Schwann cell characteristics from adult canine brains. Neuropathol. Appl. Neurobiol. 34: 621-637.

Panzera, Y-, Sarute, N., Iraola, G., Hernández, M., Pérez, R. 2015. Molecular phylogeography of canine distemper virus: Geographic origin and global spreading. Mol Phylogenet Evol Elsevier Inc. 92:147–54. De: doi.org/10.1016/j.ympev.2015.06.015

Pardo, I. D. R., 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, 5009-5017.

Pillet, S., von Messling, V. 2009. Canine distemper virus selectively inhibits apoptosis progression in infected immune cells. J Virol.12: 6279-6287.

Pinheiro, A. O., Cardoso, M. T, Vidane A. S, Casals J. B, Passarelli, D. 2016 Controversial results of therapy with mesenchymal stem cells in the acute phase of canine distemper disease. Genet Mol Res. 15:1–14.

Pinotti, M. A. 2012. Distemper Canino: evaluación de dos alternativas terapéuticas y caracterización de aspectos clínico-epidemiológicos en la ciudad de Santa Fe, durante los años 1998-2009. Recuperado a partir de http://bibliotecavirtual.unl.edu.ar:8080/tesis/handle/11185/323

Placek, K. M., Coffre, S., Maiella, E., Bianchi, L., Rogge. 2009. Genetic and epigenetic networks controlling T helper 1 cell differentiation. Immunology 127, 155-162.

Plattet, P., Cherpillod, P., Wiener, D., Zipperle, L., Vandevelde, M., Wittek. R., Zurbriggen, A. 2007. Signal peptide and helical bundle domains of virulent canine distemper virus fusion protein restrict fusogenicity. *J. Virol*. 81, 11413-11425.

Pfeuffer, J. K., Puschel, V., ter Meulen, J., Schneider-Schaulies, S., Niewiesk. 2003. Extent of measles virus spread and immune suppression differentiates between wild-type and vaccine strains in the cotton rat model (Sigmodon hispidus). J. Virol. 77:150–158.

Pope, J. P., Miller, D. L., Riley, M. C., Anis, E., Wilkes, R. P. 2016. Characterization of a novel canine distemper virus causing disease in wildlife. J Vet Diagn Invest 28:506– 513.

Prager, K. C, Mazet, J. K., Dubovi, E. J., Frank, L. G, Munson, L., Wagner, A. P. 2012 Rabies virus and canine distemper virus in wild and domestic carnivores in Northern Kenya: Are domestic dogs the reservoir? Ecohealth. 9(4):483– 98.

Rahman, I. Regulation of nuclear factor-κB, activator protein-1, and glutathione levels by tumor necrosis factor-α and dexamethasone in alveolar epithelial cells. Biochem. Pharmacol. 2000, 60, 1041–1049. Rudd P, Cattaneo R, von Messling V. 2006. Canine Distemper virus uses both the anterograde and the hematogenous pathway for neuroinvasion. J Virol. 80: 9361-9370.

Riley, M. C., Wilkes, R. P. 2015. Sequencing of emerging canine distemper virus strain reveals new distinct genetic lineage in the United States associated with disease in wildlife and domestic canine populations. *Virol J.* 12: 219.

Rzezutka A, Mizak, B. 2002. Application of N-PCR for diagnosis of distemper in dogs and fur animals. Vet Microbiol. 88(1):95–103

Sarute, N., Perez, R., Aldaz, J., Alfieri, A. A., Alfieri, A. F., Name, D., Llanes, J., Hernández, M., Francia, L., Panzera, Y. 2014. Molecular typing of canine distemper virus strains reveals the presence of a new genetic variant in South America. Sección Genética Evolutiva, Instituto de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de la República. Montevideo, Uruguay: Virus Genes. 48:474–478.

Sawatsky, B., von Messling, V. 2010. Canine distemper viruses expressing a hemagglutinin without N-glycans lose virulence but retain immunosuppression. *J. Virol*. 84, 2753-2761.

Schneider-Schaulies, S., Ter Meulen, V. 2002. Measles virus and immunomodulation: Molecular bases and perspectives. *Expert Reviews in Molecular Medicine, 4*(13), 1-18. doi:10.1017/S1462399402004696.

Schobesberger, M., Summerfield, A., Doherr, M.G., Zurbriggen, A., Griot, C. 2005. Canine distemper virus-induced depletion of uninfected lymphocytes is associated with *apoptosis. Vet Immunol Immunopathol.* 104: 33-44.

Segawa, H., A. Inakawa, T. Yamashita, and H. Taira. 2003. Functional analysis of individual oligosaccharide chains of Sendai virus hemagglutininneuraminidase protein. Biosci. Biotechnol. Biochem. 67:592–598.

Seki, F., Ono, N., Yamaguchi, R., Yanagi Y, Y. 2003. Efficient isolation of wild strains of canine distemper virus in Vero cells expressing canine SLAM (CD150) and their adaptability to marmoset B95 a cells. J. Virol. 77, 9943-9950.

Shah, A., Javid, G., Zargar, S., Teli, F., Khan, B., Yattoo, G., Gulzar, G., Sodhi, J., Khan, M., Shoukat, A. y Saif, R. 2013. Safety and efficacy of 1-week levofloxacin-based triple therapy in first-line treatment for Helicobacter pylori-related peptic ulcer disease in Kashmir, India, Indian Journal of Gastroenterology. (32), 32-36.

Sidhu MS, Menonna JP, Cook SD, Dowling PC, Udem SA. 1993. Canine distemper virus L gene: Sequence and comparison with related viruses. J. of Virology. 193: 50-65.

Sidorenko, S. P, Clark, E. A. 2003. The dual-function CD150 receptor subfamily: the viral attraction. Nat Immunol.4: 19-24.

Stern, L.B., Greenberg, M., Gershoni, J.M., Rozenblatt, S. 1995. The hemagglutinin envelope protein of canine distemper virus (CDV) confers cell tropism as illustrated by CDV and measles virus complementation analysis. *J. Virol.* 69, 1661-1668.

Suter, S. E., Chein, M. B., von Messling, V., Yip, B., Cattaneo, R., Vernau, W., Madewell, B.R., London, C. A. 2005. In vitro canine distemper virus infection of canine lymphoid cells: a prelude to oncolytic therapy for lymphoma. Clin Cancer Res. 11: 1579-1587

Swango, L. 1992. Moquillo canino. En: Ettinger, J.; Tratado de medicina interna veterinaria. Enfermedades del perro y gato. Tomo I. 3a Ed. Buenos Aires Argentina: Edit. Intermédica. p 322-325.

Summers, B. A., Appel, M. J. 1994. Aspects of canine distemper virus and measles virus encephalomyelitis. Neuropathol Appl Neurobiol 20, 525-534

Tatsuo, H., Ono, N., Yanagi, Y. 2001. Morvilliviruses use signaling lymphocyte activation molecules (CD150) as cellular receptors. J Virol. 75: 5842-5850

Triana-Verástegui, J. 2014. *Determinación del perfil farmacocinético de la plata después de la administración de nanopartículas de plata en dos modelos animales*. Universidad Autónoma de Nuevo León de http://eprints.uanl.mx/4022/

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, 59-63.

Vandevelde, M., Zurbriggen, A. 2005. Demyelination in canine distemper virus infection. Acta Neuropathol. 109: 56-68.

Vázquez-Muñoz, R. 2013. La bionanotecnología y su divulgación científica en México. *Tema del mes*. Recuperado a partir de http://www.ru.tic.unam.mx/tic/handle/123456789/2111

Vazquez-Muñoz, R., Borrego, B., Juárez-Moreno, K., García-García, M., Mota Morales, J. D., Bogdanchikova, N., & Huerta-Saquero, A. 2017. Toxicity of silver nanoparticles in biological systems: Does the complexity of biological systems matter? *Toxicology Letters*, *276*, 11–20. doi: 10.1016/j.toxlet.2017.05.007

Von Boehmer, H. 2007. Oral tolerance: is it all retinoic acid? J Exp Med 204, 1737-1739.

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: 6418-6427.

Von Messling, V., Cattaneo, R. 2002. Amino-terminal precursor sequence modulates canine distemper virus fusion protein function. *J Virol*. 76: 4172-4180.

Von Messling, V., Springfeld, C., Devaux, P., Cattaneo, R. 2003. A ferret model of canine distemper virus virulence and inmunosuppression. J Virol. 77: 12579-12591.

Von Messling, V., Milosevic, D., Cattaneo, R. 2004a. Canine distemper virus and measles virus fusion glycoprotein trimers: partial membrane-proximal ectodomain cleavage enhances function. *J. Virol*. 78, 7894-7903.

Von Messling, V., Milosevic, D., Cattaneo, R. 2004b. Tropism illuminated: lymphocyte-based pathways blazed by lethal morbillivirus through the host immune system. P Natl Acad Sci.101: 14216-14221.

Von Messling, V., Oezguen, N., Zheng, Q., Vongpunsawad, S., Braun, W., Cattaneo, R. 2005. Nearby clusters of hemagglutinin residues sustain SLAM dependent canine distemper virus entry in peripheral blood mononuclear cells. *J Virol*.79: 5857-5862.

Wheeler, J. T. 2007. El moquillo canino ¿tiene cura? REDVET. De: http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n070707/070701.pdf

Wilkes, R. P, Sanchez, E., Riley, M. C., Kennedy, M. A. 2014. Real-time reverse transcription polymerase chain reaction method for detection of canine distemper virus modified live vaccine shedding for differentiation from infection with wild-type strains. J Vet Diagn Invest 26:27–34.

Wostenberg, D. J., Walker, N., Fox, K. A., Spraker, T. R., Piaggio, A. J., Gilbert, A. 2018 Evidence of two cocirculating canine distemper virus strains in mesocarnivores from northern Colorado, USA. *Journal of Wildlife Diseases* 54 (3), 534-543.

Zipperle, L., Langedijk, J.M.P., Orvell, C., *et al.* 2010. Identification of key residues in virulent canine distemper virus hemagglutinin that control CD150/SLAM-binding activity. J. Virol. 84, 9618-24.

Zhao, J. J., Yan, X. J., Wu, W. 2008. Genetic variations and cellular receptors of canine distemper virus-a review. Wei Sheng Wu Xue Bao.48: 986-991.

Anexos

Anexo 1. Tabla de la historia clínica completa de los pacientes

PACIENTE	EDAD	RAZA	SEXO	SIGNOLOGÍA	VACUNACIÓN	DIAGNOSTICADO	TRATAMIENTO CON AgNPs	FALLECIÓ
GOLIATH	2 años	Labrador	Macho	Neurológico	No	Sí	No	Sí
ROMINA	6 meses	Chihuahua	Hembra	Neurológico	No	Sí	No	-
JUGUETÓN	8 años	Pug	Macho	Neurológico	No	No	No	No
BRUNO	8 años	Boxer	Macho	Neurológico	Sí	No	No	No
ELA	2 años	Basset Hound	Hembra	Neurológico	No	No	No	Sí
DRAKO	1 año	Pastor Belga	Macho	Neurológico	Sí	No	No	Sí
AMAZONA	3 años	Poodle	Hembra	Neurológico, digestivo	Sí	Sí	Sí	No
BRADY	18 meses	Golden	Macho	Neurológico, digestivo	Sí	Sí	Sí	No
SATYN	9 meses	Mestizo	Hembra	Neurológico, respiratorio	No	Sí	Sí	Sí
BENITO	5 meses	Labrador	Macho	Neurológico, respiratorio	Sí	Sí	Sí	No
OKI	6 años	Golden	Macho	Neurológico, respiratorio	No	Sí	Sí	No
SBEKA	2 años	Vizsla	Macho	Neurológico, respiratorio	Sí	Sí	Sí	No
JENA	3.5 meses	Boxer	Hembra	Neurológico, respiratorio	Sí	Sí	Sí	Sí
DON	1.4 años	Weimaraner	Macho	Neurológico, respiratorio, digestivo	Sí	Sí	Sí	No
BICO	8 meses	Husky	Macho	Neurológico, respiratorio, digestivo	Sí	Sí	No	Sí
COYOTA	8 años	Pit bull mix	Hembra	Neurológico, respiratorio, digestivo	No	No	Sí	Sí
ALFREDO	11 meses	Pug	Macho	Neurológico, respiratorio, digestivo	No	No	Sí	Sí
BAILEY	3 años	Mestizo	Macho	Neurológico, respiratorio, dermatológico	No	No	Sí	No

PACIENTE	EDAD	RAZA	SEXO	SIGNOLOGÍA	VACUNACIÓN	DIAGNOSTICADO	TRATAMIENTO CON AgNPs	FALLECIÓ
LEIKA	7.5 meses	Bulldog fránces	Hembra	Neurológico, respiratorio, ocular	Sí	Sí	Sí	Sí
ALISHA	4 meses	Pit bull	Hembra	Neurológico, respiratorio, ocular	No	No	No	No
ROLO	3.5 meses	Pastor Alemán	Macho	Neurológico, digestivo, ocular	SÍ	Sí	SÍ	No
COTY	3 meses	Mestizo	Hembra	Neurológico, digestivo, ocular	No	Sí	No	Sí
ROCKO	1.5 años	Pekines	Macho	Neurológico, digestivo, ocular	No	Sí	Sí	No
MALUMA	4 meses	Mestizo	Macho	Neurológico, dermatológico, ocular	No	No	Sí	Sí
SLINKI	3 meses	Dachhound	Macho	Neurológico, digestivo, ocular, respiratorio	Sí	No	Sí	Sí
SURY	4 años	Schnauzer	Hembra	Neurológico, digestivo, ocular, respiratorio	No	Sí	Sí	Sí
JOSHI	5 meses	Akita	Macho	Neurológico, digestivo, ocular, respiratorio	Sí	Sí	Sí	Sí
LOGAN	5 meses	Pastor Holandes	Macho	Neurológico, digestivo, ocular, respiratorio	Sí	Sí	Sí	Sí
HARU	2 años	Pug	Hembra	Neurológico, ocular, respiratorio, dermatológico	Sí	Sí	No	Sí
LUNAR	2 meses	Pug	Macho	Neurológico, digestivo, ocular, respiratorio, dermatológico	Sí	Sí	Sí	SÍ
LÁZARO	2 meses	Pug	Macho	Neurológico, digestivo, ocular, respiratorio, dermatológico	Sí	Sí	SÍ	Sí
MAX	6 meses	Pit bull	Macho	Neurológico, digestivo, ocular, respiratorio, dermatológico	Sí	Sí	Sí	Sí

PACIENTE	EDAD	RAZA	SEXO	SIGNOLOGÍA	VACUNACIÓN	DIAGNOSTICADO	TRATAMIENTO CON AgNPs	FALLECIÓ
NIKY	8 años	Schnauzer	Hembra	Digestivo	No	Sí	No	No
HUNTER	3 meses	Husky	Macho	Digestivo	Sí	Sí	Sí	Sí
MACA	5 meses	Mestizo	Hembra	Digestivo	Sí	No	No	No
ANASTASIA	1 año	Pit bull	Hembra	Respiratorio	No	No	No	Sí
CHINGADERA	4 meses	Pit bull/ Pastor Australiano	Hembra	Respiratorio	No	Sí	No	No
SYRA	6 años	Schnauzer	Hembra	Respiratorio	No	No	Sí	No
JACK	3 meses	Husky	Macho	Ocular	No	Sí	Sí	No
RAYITO	3 años	Husky	Macho	Ocular, respiratorio	Sí	Sí	Sí	No
LOBO	6 meses	Husky	Macho	Digestivo, Respiratorio, ocular	Sí	Sí	Sí	No
MASSON	6 meses	Husky	Macho	Digestivo, Respiratorio, ocular	No	No	No	Sí
MANCHAS	5 meses	Mastin mix	Hembra	Digestivo, Respiratorio, ocular, dermatológico	Sí	No	Sí	Sí

Anexo 2. Pacientes diagnosticados por PCR que no amplificaron en los genes *f* y *h* (genotificacación).

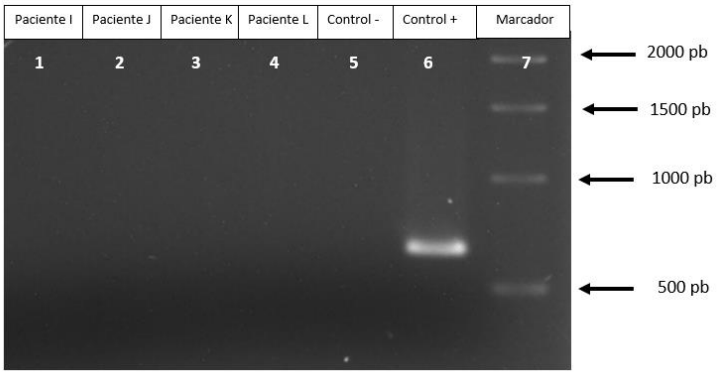


Figura 21. Productos de PCR para genotipificación del virus del moquillo canino con el par de oligonucleótidos de Arg1F (681 pb). Carril 1 al 4: Pacientes I, J, K y L que no amplificaron (**Tabla 9**), Carril 5: control negativo, Carril 6: control positivo, Carril 7: marcador de peso molecular 1 Kb DNA Ladder de la marca Sigma-Aldrich.

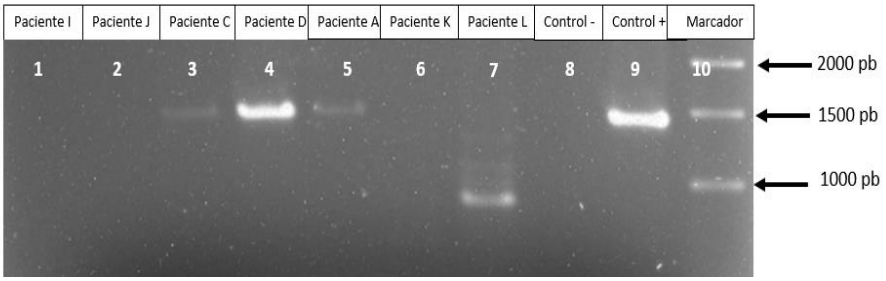
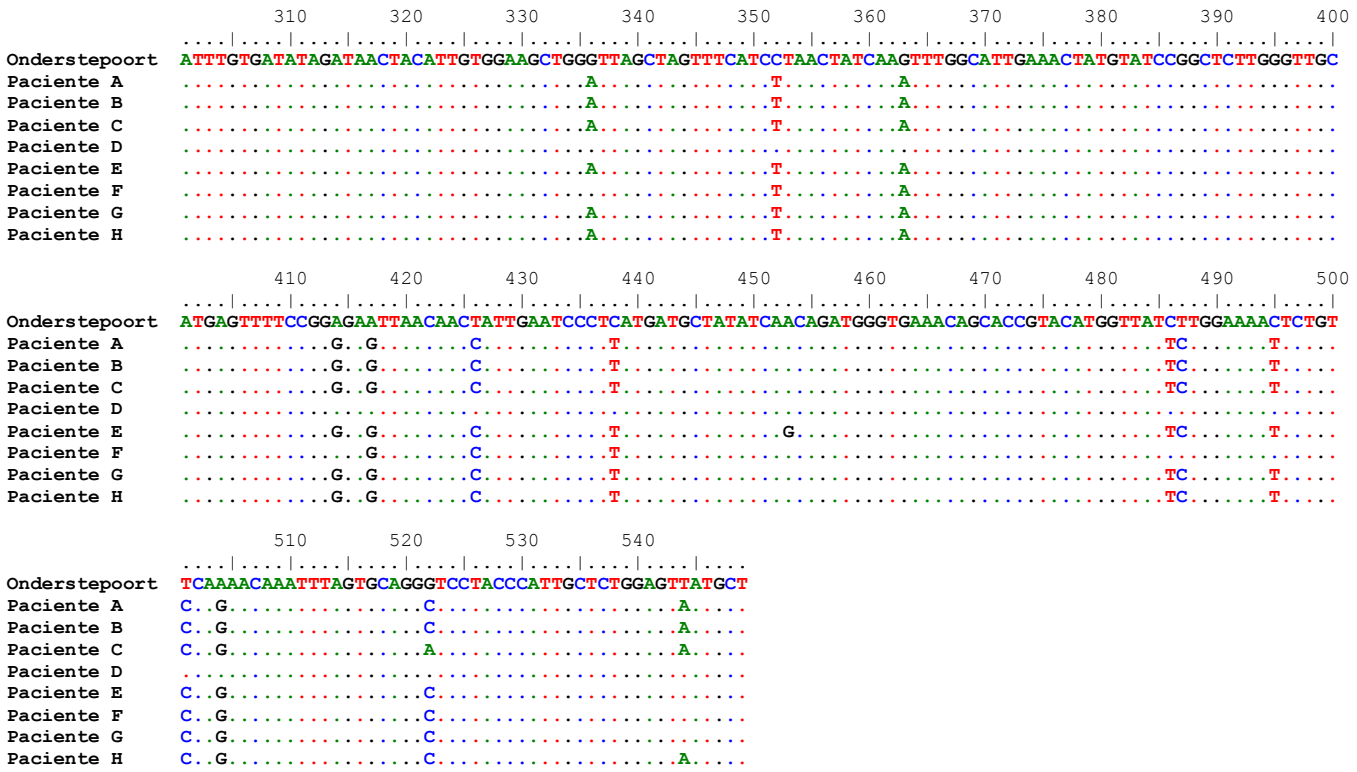


Figura 22. Productos de PCR para genotipificación del virus del moquillo canino con el par de oligonucleótidos de Chi1Hf-EUA1Hr (1422 pb). Carril 1, 2, 6 y 7: Pacientes I, J, K y L que no amplificaron (**Tabla 9**), Carril 3, 4 y 5: Pacientes C, D y A que amplificaron, Carril 8: control negativo, Carril 9: control positivo, Carril 10: marcador de peso molecular 1 Kb DNA Ladder de la marca Sigma-Aldrich. En el carril 7 del paciente L se formaron concatámeros.

Anexo 3. Alineamiento nucleotídico y animoacídico de las secuencias del gen *n* de los 8 pacientes y la cepa vacunal *Onderstepoort.*

Alineamiento nucleotídico gen *n*

```
                        10        20        30        40        50        60        70        80        90       100
                ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
Onderstepoort   GACATAGAAGTTGATAATGCTGAGCAATTCAATATATTGCTAGCTTCCATCTTGGCTCAAATTTGGATCCTGCTAGCTAAAGCGGTGACTGCTCCTGATA
Paciente A      ...............G.......................................G..............C........A..C............
Paciente B      ...............G.......................................G..............C........A..C............
Paciente C      ...............G.......................................G..............C........A..C............
Paciente D      ..................................................................................................
Paciente E      ...............G.......................................G..............C........A..C............
Paciente F      ...............G.......................................G..............C........A..C............
Paciente G      ...............G.......................................G..............C........A..C............
Paciente H      ...............G.......................................G..............C........A..C............

                       110       120       130       140       150       160       170       180       190       200
                ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
Onderstepoort   CTGCAGCCGACTCGGAGATGAGAAGGTGGATTAAGTATACCCAGCAAAGACGTGTGGTCGGAGAATTTAGAATGAACAAAATCTGGCTTGATATTGTTAG
Paciente A      .............T.................C...........A..G.......................................................
Paciente B      .............T.................C...........A..G.......................................................
Paciente C      .............T.................C...........A..G.......................................................
Paciente D      ..................................................................................................
Paciente E      .............T.................C...........A..G.......................................................
Paciente F      .............................C...........A..........................................................
Paciente G      .............T.................C...........A..G.......................................................
Paciente H      .............T.................C...........A..G.......................................................

                       210       220       230       240       250       260       270       280       290       300
                ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
Onderstepoort   AAACAGGATTGCTGAGGACCTATCTTTGAGGCGATTCATGGTGGCGCTCATCTTGGACATCAAACGATCCCCAGGGAACAAGCCTAGAATTGCTGAAATG
Paciente A      G..................T.............G...........A........A..T.....................................G...
Paciente B      ...................T.............G...........A........A..T.....................................G...
Paciente C      G..................T.............G...........A...........T.......................................
Paciente D      ..................................................A.............................................
Paciente E      ...................T.............G...........A........A..T.....................................G...
Paciente F      ...................T.........................A.............................................
Paciente G      ...................T.............G...........A........A..T.....................................G...
Paciente H      ...................T.............G...........A........A..T.....................................G...
```


310 320 330 340 350 360 370 380 390 400
Onderstepoort ATTTGTGATATAGATAACTACATTGTGGAAGCTGGGTTAGCTAGTTTCATCCTAACTATCAAGTTTGGCATTGAAACTATGTATCCGGCTCTTGGGTTGC
Paciente A .....A.....T.....A.....
Paciente B .....A.....T.....A.....
Paciente C .....A.....T.....A.....
Paciente D .....
Paciente E .....A.....T.....A.....
Paciente F .....T.....A.....
Paciente G .....A.....T.....A.....
Paciente H .....A.....T.....A.....
410 420 430 440 450 460 470 480 490 500
Onderstepoort ATGAGTTTTCCGGAGAATTAACAACTATTGAATCCCTCATGATGCTATATCAACAGATGGGTGAAACAGCACCGTACATGGTTATCTTGGAAAACTCTGT
Paciente A .....G..G.....C.....T.....TC.....T.....
Paciente B .....G..G.....C.....T.....TC.....T.....
Paciente C .....G..G.....C.....T.....TC.....T.....
Paciente D .....
Paciente E .....G..G.....C.....T.....G.....TC.....T.....
Paciente F .....G.....C.....T.....
Paciente G .....G..G.....C.....T.....TC.....T.....
Paciente H .....G..G.....C.....T.....TC.....T.....
510 520 530 540
Onderstepoort TCAAAACAAATTTAGTGCAGGGTCCTACCCATTGCTCTGGAGTTATGCT
Paciente A C..G.....C.....A.....
Paciente B C..G.....C.....A.....
Paciente C C..G.....A.....A.....
Paciente D .....
Paciente E C..G.....C.....
Paciente F C..G.....C.....
Paciente G C..G.....C.....
Paciente H C..G.....C.....A.....

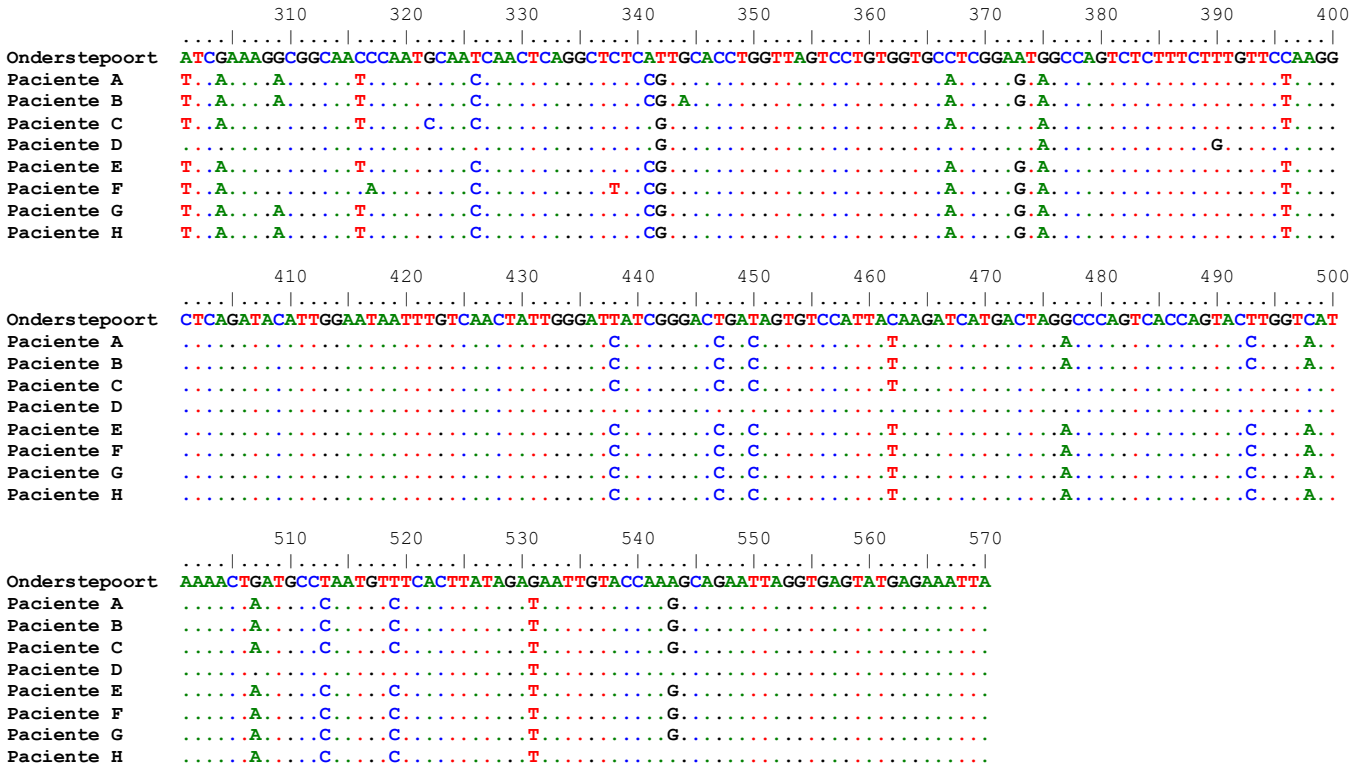
Alineamiento aminoacídico gen *n*

```
                    10        20        30        40        50        60        70        80        90       100
                    ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
Onderstepoort       DIEVDNAEQFNILLASILAQIWILLAKAVTAPDTAADSEMRRWIKYTQQRRVVGEFRMNKIWLDIVRNRIAEDLSLRRFMVALILDIKRSPGNKPRIAEM
Paciente A          .....D..................................................................................................
Paciente B          .....D..................................................................................................
Paciente C          .....D..................................................................................................
Paciente D          ........................................................................................................
Paciente E          .....D..................................................................................................
Paciente F          .....D..................................................................................................
Paciente G          .....D..................................................................................................
Paciente H          .....D..................................................................................................

                            110       120       130       140       150       160       170       180
                            ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|...
Onderstepoort       ICDIDNYIVEAGLASFILTIKFGIETMYPALGLHEFSGELTTIESLMMLYQQMGETAPYMVILENSVQNKFSAGSYPLLWSYA
Paciente A          ...........................................................................................N.
Paciente B          ...........................................................................................N.
Paciente C          ...........................................................................................N.
Paciente D          ............................................................................................
Paciente E          ............................................................................................
Paciente F          ............................................................................................
Paciente G          ............................................................................................
Paciente H          ...........................................................................................N.
```

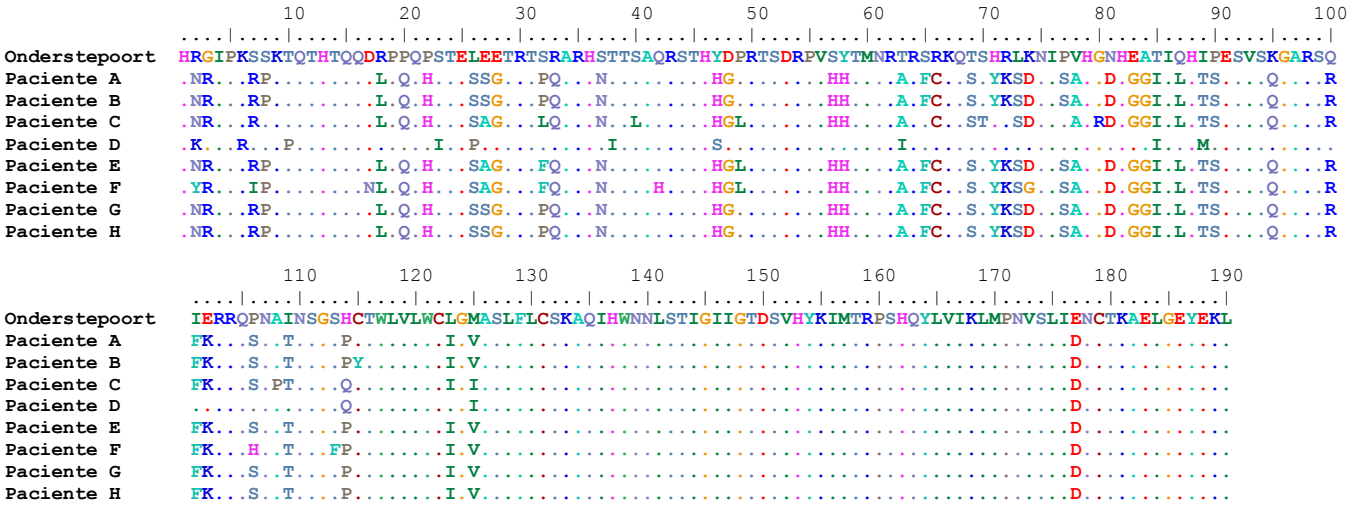
Anexo 4. Alineamiento nucleotídico y animoacídico de las secuencias del gen *f* de los 8 pacientes y la cepa vacunal *Onderstepoort.*

Alineamiento nucleotídico gen *f*

```
                         10        20        30        40        50        60        70        80        90       100
                ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
Onderstepoort   CACAGGGGAATCCCCAAAAGCTCCAAAACCCAAACACATACCCAACAAGACCGCCCCCCACAACCCAGCACCGAACTCGAAGAGACCAGGACCTCCCGAG
Paciente A      ....ACA.............AC................C.............T.....A.....A......T...TC.TCC.G......A...C...A..
Paciente B      ....ACA.............AC................C.............T.....A.....A......T...TC.TCC.G......A...C...A..
Paciente C      ....ACA.............A.................C.............T.....A...G.A......T...TC..CC.G......A...CT..A..
Paciente D      ....A...........G..........C...................G..............G....T........C.......................
Paciente E      ....ACA.............AC................C.............T.....A.....A...T..T...TC..CC.G......A....T..A..
Paciente F      ...TACA............TAC.G..............C.........A...T.....A.....A......T...TC..CC.G......A....T..A..
Paciente G      ....ACA.............AC................C.............T.....A.....A......T...TC.TCC.G......A...C...A..
Paciente H      ....ACA.............AC................C.............T.....A.....A......T...TC.TCC.G......A...C...A..

                        110       120       130       140       150       160       170       180       190       200
                ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
Onderstepoort   CACGACACAGCACAACATCAGCTCAGCGATCCACGCACTACGATCCTCGAACATCGGACAGACCCGTCTCCTACACCATGAACAGGACCAGGTCCCGCAA
Paciente A      .........A.........G..C...............C.T.G...C..............G......CA.C....A........AG......TTT....
Paciente B      .........A.........G..C...............C.T.G...C..............G......CA.C....A........AG......TTT....
Paciente C      .........A........TG..C...............C.T.G..T...............G......CA.C....A.........G.......TT....
Paciente D      ............T..........................CT..............................................T............
Paciente E      .........A...G.....G...........T......C.T.G..T...............G......CA.C....A........AG......TTT....
Paciente F      .........A.........G.....C.....T..A...C.T.G..T...............G......CA.C....A........AG......TTT....
Paciente G      .........A.........G..C...............C.T.G...C..............G......CA.C....A........AG......TTT....
Paciente H      .........A.........G..C...............C.T.G...C..............G......CA.C....A........AG......TTT....

                        210       220       230       240       250       260       270       280       290       300
                ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
Onderstepoort   GCAAACCAGCCACAGATTGAAGAACATCCCAGTTCACGGAAACCACGAGGCCACCATCCAGCACATACCAGAGAGTGTCTCAAAAGGAGCGAGATCCCAG
Paciente A      ....T.....T...A..CAG.T......T.G.C.......G......G..GT.TT....TT....C.T.............CC.......A.......G.
Paciente B      ....T.....T...A..CAG.T......T.G.C.......G......G..GT.TT....TT....C.T.............CC.......A.......G.
Paciente C      ....T...C........CAG.C........G.C....A..G......G..G..TT....TT....C.T.............CC...............G.
Paciente D      ......T............................................T.TT...........G.................................
Paciente E      ....T.....T...A..CAG.T......T.G.C.......G....T.G..GT.TT....TT....C.T.............CC.......A.......G.
Paciente F      ....T.....T...A..CAGGT......T.G.C.......G......G..GT.TT....TT....C.T.............CC.......A.......G.
Paciente G      ....T.....T...A..CAG.T......T.G.C.......G......G..GT.TT....TT....C.T.............CC.......A.......G.
Paciente H      ....T.....T...A..CAG.T......T.G.C.......G......G..GT.TT....TT....C.T.............CC.......A.......G.
```


310 320 330 340 350 360 370 380 390 400
Onderstepoort ATCGAAAGGCGGCAACCCAATGCAATCAACTCAGGCTCTCATTGCACCTGGTTAGTCCTGTGGTGCCTCGGAATGGCCAGTCTCTTTCTTTGTTCCAAGG
Paciente A T..A....A......T.........C.............CG.....................A.....G.A.....................T....
Paciente B T..A....A......T.........C.............CG.A...................A.....G.A.....................T....
Paciente C T..A...........T.....C...C.............G.....................A.......A.....................T....
Paciente D .....................................G.....................A.............G..........
Paciente E T..A...........T.........C.............CG.....................A.....G.A.....................T....
Paciente F T..A...........A.........C..........T..CG.....................A.....G.A.....................T....
Paciente G T..A....A......T.........C.............CG.....................A.....G.A.....................T....
Paciente H T..A....A......T.........C.............CG.....................A.....G.A.....................T....
410 420 430 440 450 460 470 480 490 500
Onderstepoort CTCAGATACATTGGAATAATTTGTCAACTATTGGGATTATCGGGACTGATAGTGTCCATTACAAGATCATGACTAGGCCCAGTCACCAGTACTTGGTCAT
Paciente A .....................................C........C..C..........T.............A.............C....A..
Paciente B .....................................C........C..C..........T.............A.............C....A..
Paciente C .....................................C........C..C..........T.....................................
Paciente D ....
Paciente E .....................................C........C..C..........T.............A.............C....A..
Paciente F .....................................C........C..C..........T.............A.............C....A..
Paciente G .....................................C........C..C..........T.............A.............C....A..
Paciente H .....................................C........C..C..........T.............A.............C....A..
510 520 530 540 550 560 570
Onderstepoort AAAACTGATGCCTAATGTTTCACTTATAGAGAATTGTACCAAAGCAGAATTAGGTGAGTATGAGAAATTA
Paciente A ......A.....C.....C..........T..........G.....................
Paciente B ......A.....C.....C..........T..........G.....................
Paciente C ......A.....C.....C..........T..........G.....................
Paciente D ....T.....................
Paciente E ......A.....C.....C..........T..........G.....................
Paciente F ......A.....C.....C..........T..........G.....................
Paciente G ......A.....C.....C..........T..........G.....................
Paciente H ......A.....C.....C..........T.....................

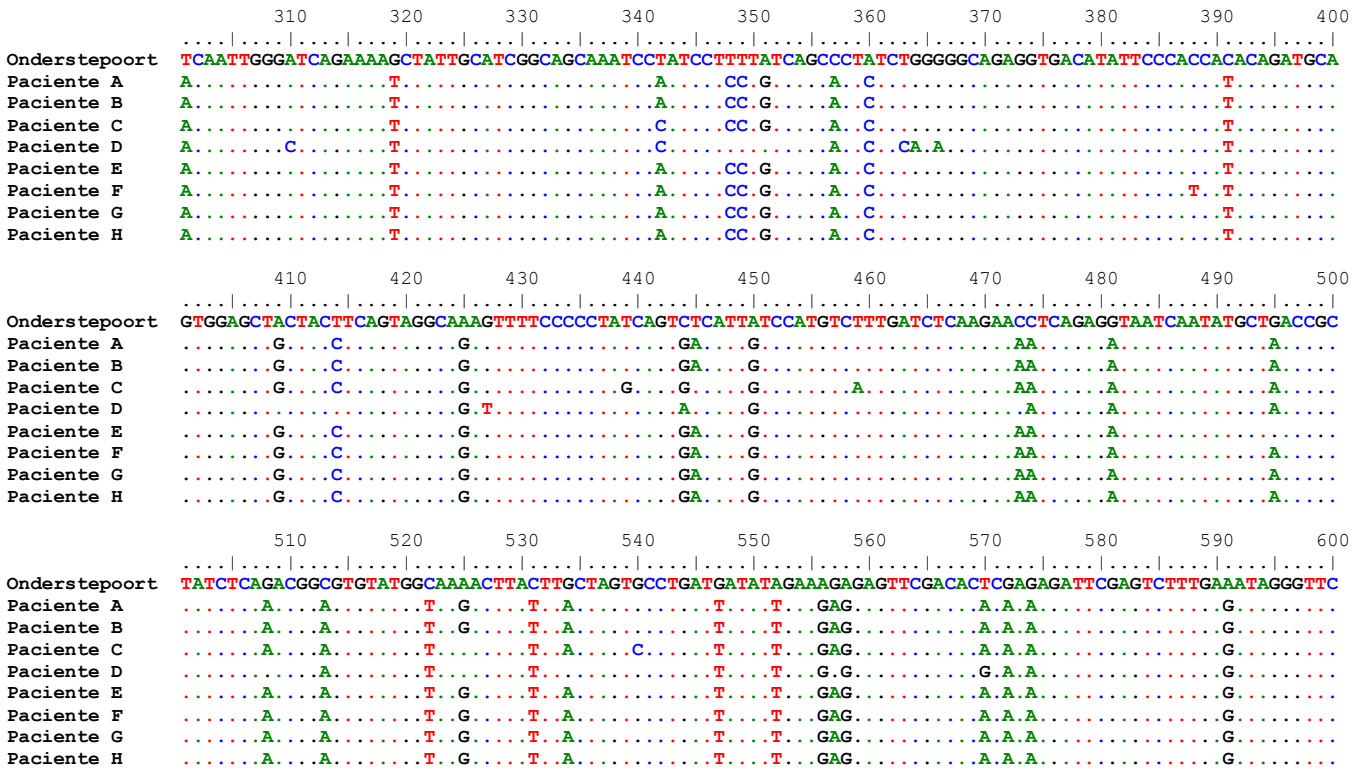
Alineamiento aminoacídico gen *f*

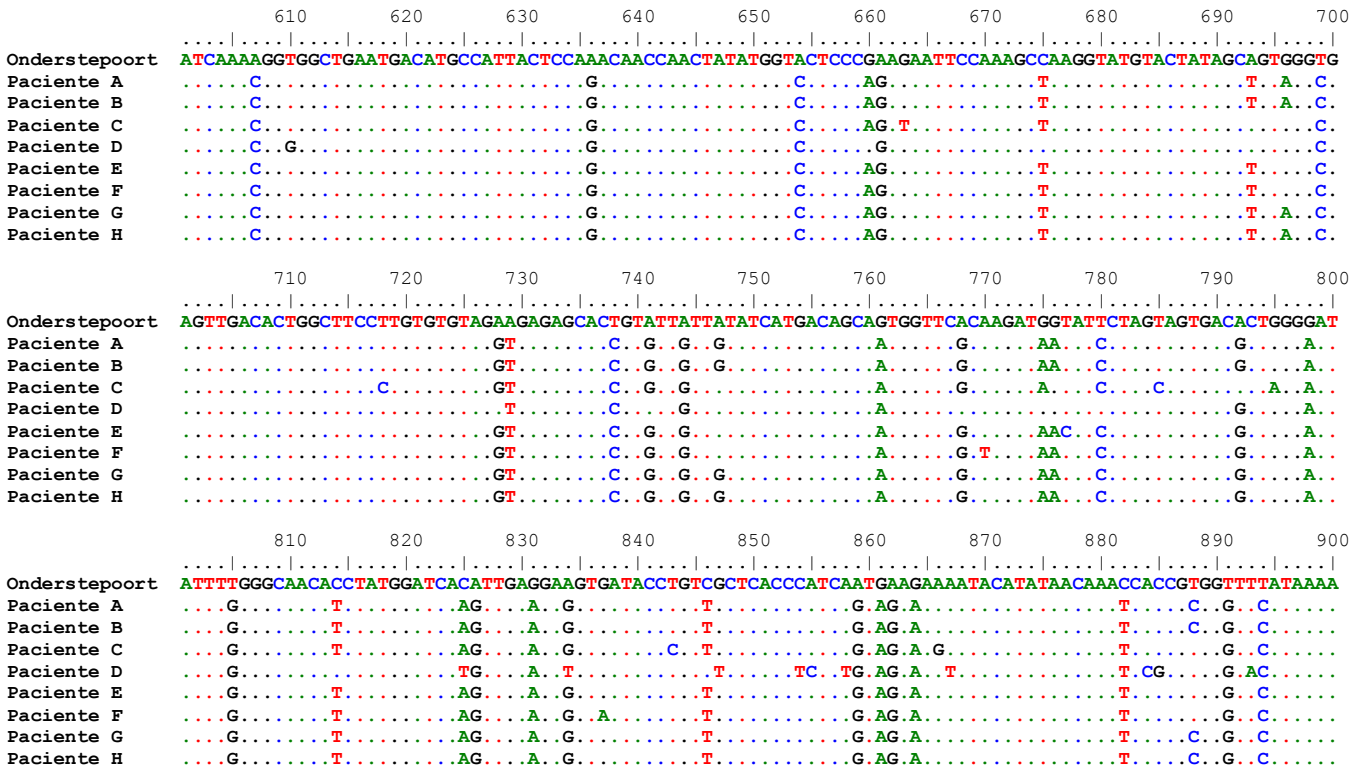


Anexo 5. Alineamiento nucleotídico y animoacídico de las secuencias del gen *h* de los 8 pacientes y la cepa vacunal *Onderstepoort.*

Alineamiento nucleotídico gen *h*

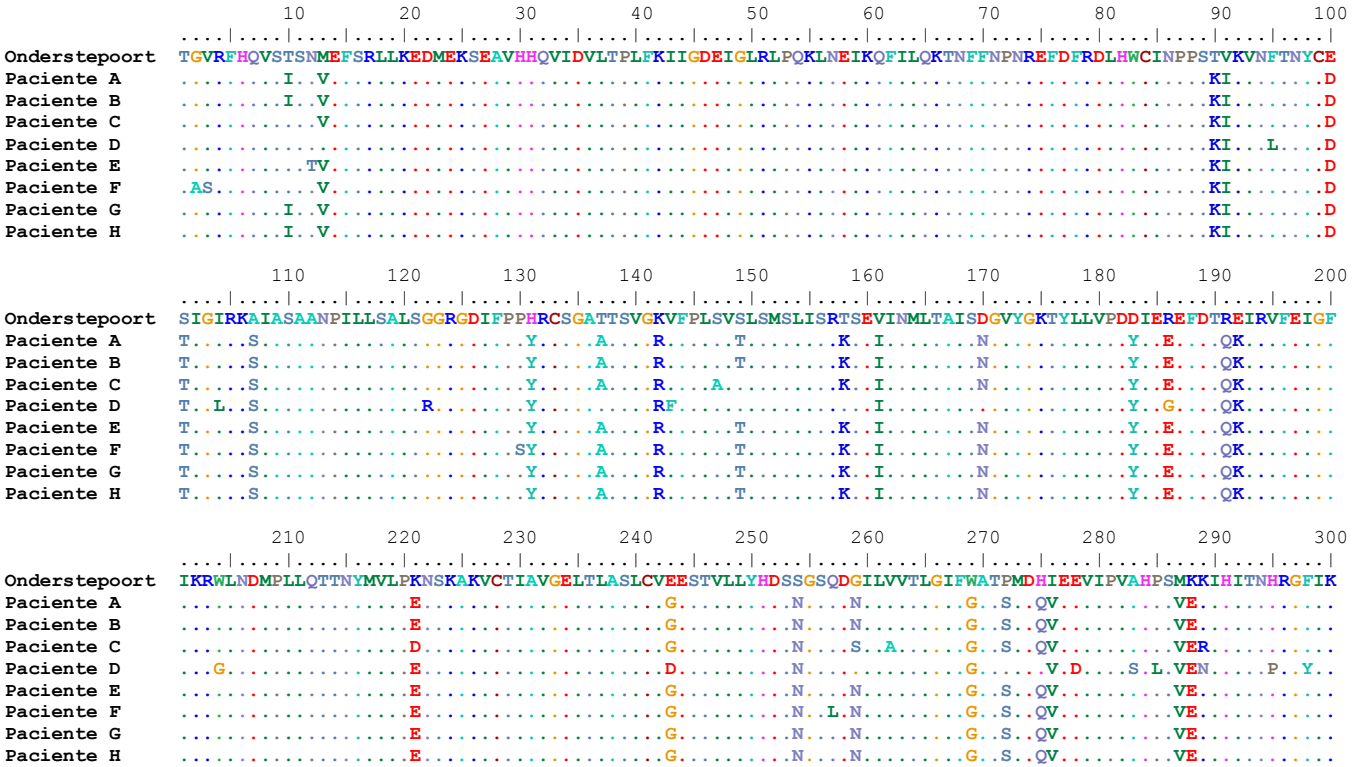
```
                        10        20        30        40        50        60        70        80        90       100
                ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
Onderstepoort   ACTGGAGTTCGATTTCACCAAGTATCAACTAGTAATATGGAATTTAGCAGATTGCTGAAAGAGGATATGGAGAAATCAGAGGCCGTACATCACCAAGTCA
Paciente A      ...............C.............T...C..CG.................................................T................
Paciente B      ...............C.............T...C..CG.................................................T................
Paciente C      ................................C..CG..........T.....................................T................
Paciente D      ................................C...................................................................
Paciente E      ...............C.................C.CCG.................................................T................
Paciente F      ....CGAG......C.................C..CG.................................................T................
Paciente G      ...............C.............T...C..CG.................................................T................
Paciente H      ...............C.............T...C..CG.................................................T................

                       110       120       130       140       150       160       170       180       190       200
                ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
Onderstepoort   TAGATGTCTTGACACCGCTCTTCAAGATTATTGGAGATGAGATTGGGTTACGGTTGCCACAAAAGCTAAACGAGATCAAACAATTTATCCTTCAAAAGAC
Paciente A      .......T.....G...........A.........................C..........A....................C..............
Paciente B      .......T.....G...........A.........................C..........A....................C..............
Paciente C      .......T.....G...........A.........................C..........A....................C..............
Paciente D      ........................A.........................................A...................................
Paciente E      .......T.....G...........A........G..................C..........A....................C..............
Paciente F      .......T.....C...........A.........................C..........A....................C..............
Paciente G      .......T.....G...........A.........................C..........A....................C..............
Paciente H      .......T.....G...........A.........................C..........A....................C..............

                       210       220       230       240       250       260       270       280       290       300
                ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
Onderstepoort   AAATTTCTTCAATCCGAACAGAGAATTCGACTTCCGCGATCTCCACTGGTGCATTAACCCGCCTAGTACGGTCAAGGTGAATTTTACTAATTACTGTGAG
Paciente A      ...C...........T.....G..............T.................C.....A.......A.A.........................C..T
Paciente B      ...C...........T.....G..............T.................C.....A.......A.A.........................C..T
Paciente C      ...C...........T.....G..............T.......................A.......A.A.........................C..T
Paciente D      ...C.................G.......................................A.......A.A.............A...........C..T
Paciente E      ...C...........T.....G..............T.................C.....A.......A.A.........................C..T
Paciente F      ...C...........T.....G..............T.................C.....A.......A.A.........................C..T
Paciente G      ...C...........T.....G..............T.................C.....A.......A.A.........................C..T
Paciente H      ...C...........T.....G..............T.................C.....A.......A.A.........................C..T
```


310 320 330 340 350 360 370 380 390 400
Onderstepoort TCAATTGGGATCAGAAAAGCTATTGCATCGGCAGCAAATCCTATCCTTTTATCAGCCCTATCTGGGGGCAGAGGTGACATATTCCCACCACACAGATGCA
Paciente A A.....T.....A.....CC.G.....A..C.....T.....
Paciente B A.....T.....A.....CC.G.....A..C.....T.....
Paciente C A.....T.....C.....CC.G.....A..C.....T.....
Paciente D A.....C.....T.....C.....A..C..CA.A.....T.....
Paciente E A.....T.....A.....CC.G.....A..C.....T.....
Paciente F A.....T.....A.....CC.G.....A..C.....T..T.....
Paciente G A.....T.....A.....CC.G.....A..C.....T.....
Paciente H A.....T.....A.....CC.G.....A..C.....T.....
410 420 430 440 450 460 470 480 490 500
Onderstepoort GTGGAGCTACTACTTCAGTAGGCAAAGTTTTCCCCCTATCAGTCTCATTATCCATGTCTTTGATCTCAAGAACCTCAGAGGTAATCAATATGCTGACCGC
Paciente A .....G....C.....G.....GA....G.....AA.....A.....A.....
Paciente B .....G....C.....G.....GA....G.....AA.....A.....A.....
Paciente C .....G....C.....G.....G....G.....G.....A.....AA.....A.....A.....
Paciente D .....G.T.....A.....G.....A.....A.....A.....
Paciente E .....G....C.....G.....GA....G.....AA.....A.....
Paciente F .....G....C.....G.....GA....G.....AA.....A.....A.....
Paciente G .....G....C.....G.....GA....G.....AA.....A.....A.....
Paciente H .....G....C.....G.....GA....G.....AA.....A.....A.....
510 520 530 540 550 560 570 580 590 600
Onderstepoort TATCTCAGACGGCGTGTATGGCAAAACTTACTTGCTAGTGCCTGATGATATAGAAAGAGAGTTCGACACTCGAGAGATTCGAGTCTTTGAAATAGGGTTC
Paciente A .....A....A.....T..G.....T..A.....T....T...GAG.....A.A.A.....G.....
Paciente B .....A....A.....T..G.....T..A.....T....T...GAG.....A.A.A.....G.....
Paciente C .....A....A.....T.....T..A.....C.....T....T...GAG.....A.A.A.....G.....
Paciente D .....A.....T.....T.....T....T...G.G.....G.A.A.....G.....
Paciente E .....A....A.....T..G.....T..A.....T....T...GAG.....A.A.A.....G.....
Paciente F .....A....A.....T..G.....T..A.....T....T...GAG.....A.A.A.....G.....
Paciente G .....A....A.....T..G.....T..A.....T....T...GAG.....A.A.A.....G.....
Paciente H .....A....A.....T..G.....T..A.....T....T...GAG.....A.A.A.....G.....


610 620 630 640 650 660 670 680 690 700
Onderstepoort ATCAAAAGGTGGCTGAATGACATGCCATTACTCCAAACAACCAACTATATGGTACTCCCGAAGAATTCCAAAGCCAAGGTATGTACTATAGCAGTGGGTG
Paciente A
Paciente B
Paciente C
Paciente D
Paciente E
Paciente F
Paciente G
Paciente H
710 720 730 740 750 760 770 780 790 800
Onderstepoort AGTTGACACTGGCTTCCTTGTGTGTAGAAGAGAGCACTGTATTATTATATCATGACAGCAGTGGTTCACAAGATGGTATTCTAGTAGTGACACTGGGGAT
Paciente A
Paciente B
Paciente C
Paciente D
Paciente E
Paciente F
Paciente G
Paciente H
810 820 830 840 850 860 870 880 890 900
Onderstepoort ATTTTGGGCAACACCTATGGATCACATTGAGGAAGTGATACCTGTCGCTCACCCATCAATGAAGAAAATACATATAACAAACCACCGTGGTTTTATAAAA
Paciente A
Paciente B
Paciente C
Paciente D
Paciente E
Paciente F
Paciente G
Paciente H

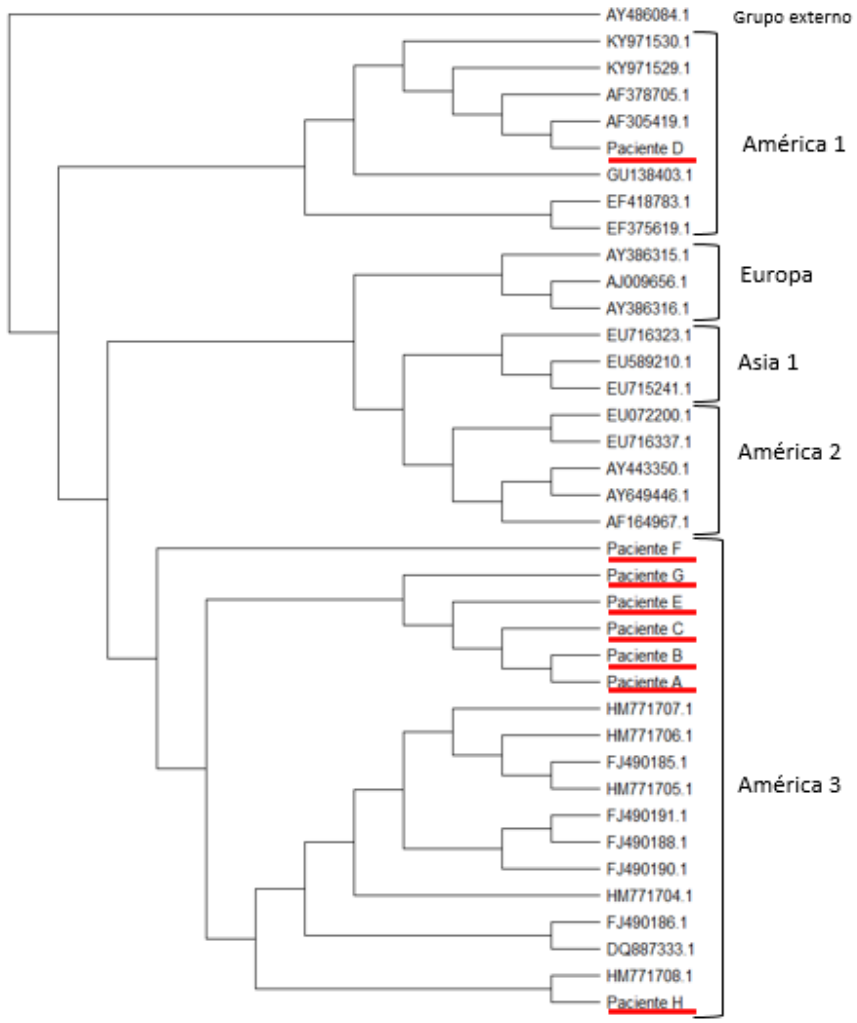
```
                910       920       930       940       950       960       970       980       990       1000
                ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
Onderstepoort   GATTCAATTGCAACCTGGATGGTGCCTGCCCTGGCCTCTGAGAAACAAGAAGAACAAAAAGGTTGTCTGGAGTCAGCTTGTCAAAGAAAAACCTACCCCA
Paciente A      ........A.....................AT...T.............G.....G.......AA......A.....G.........G......T.......T.
Paciente B      ........A.....................AT...T.............G.....G.......AA......A.....G.........G......T.......T.
Paciente C      ........A.....................AT...T.............G.....G.......AA............G.................T.......T.
Paciente D      ........GAGCCATC..............AG...T.............G.....G....G.AAG............G.........G......T.......T.
Paciente E      ........A.....................AT...T.............G.....G.......AA............G.................T.......T.
Paciente F      ........A......C..............AT...T.............G.....G.......AA............G.................T.......T.
Paciente G      ........A....A.C..............AT...T.............G.....G.......AA............G.........G.......T......T.
Paciente H      ........A.....................AT...T.............G.....G.......AA......A.....G.........G......T.......T.

                1010
                ....|....|....
Onderstepoort   TGTGCAACCAAGCG
Paciente A      ..........A..
Paciente B      .......T...A..
Paciente C      ....T....C.A..
Paciente D      ..........A..
Paciente E      ..........A..
Paciente F      ..........A..
Paciente G      ..........A..
Paciente H      ..........A..
```

Alineamiento aminoacídico gen *h*

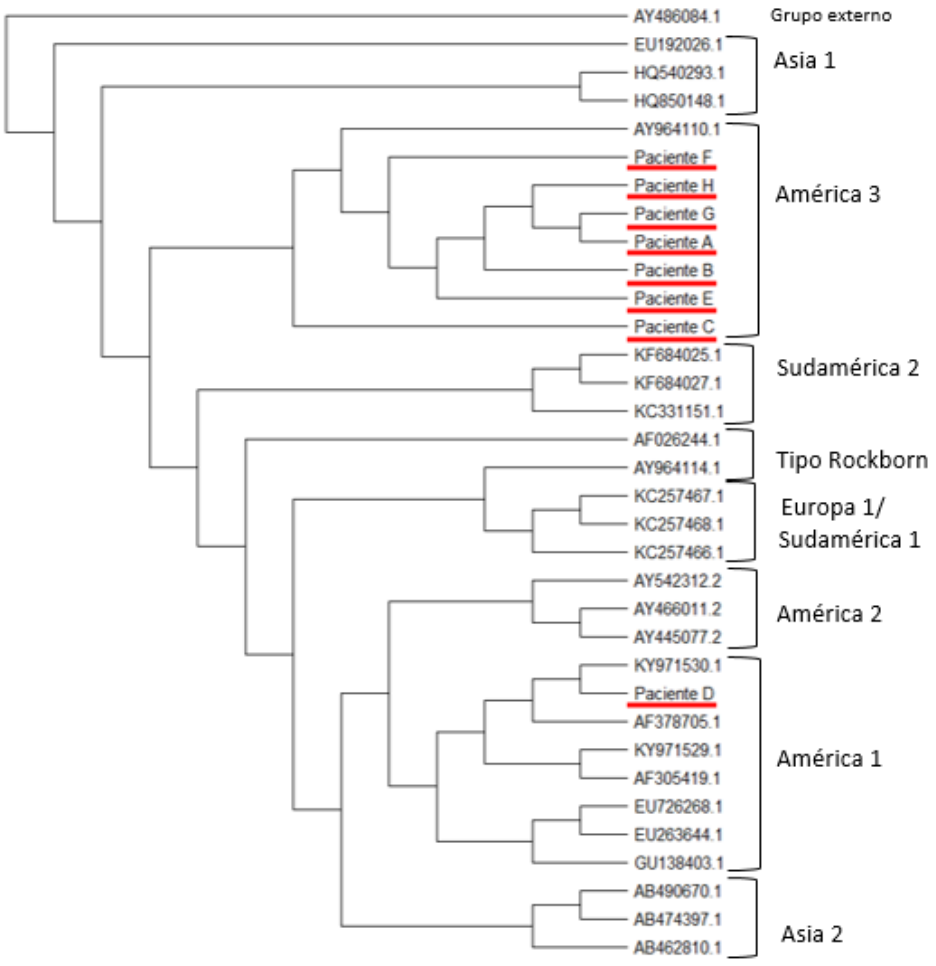
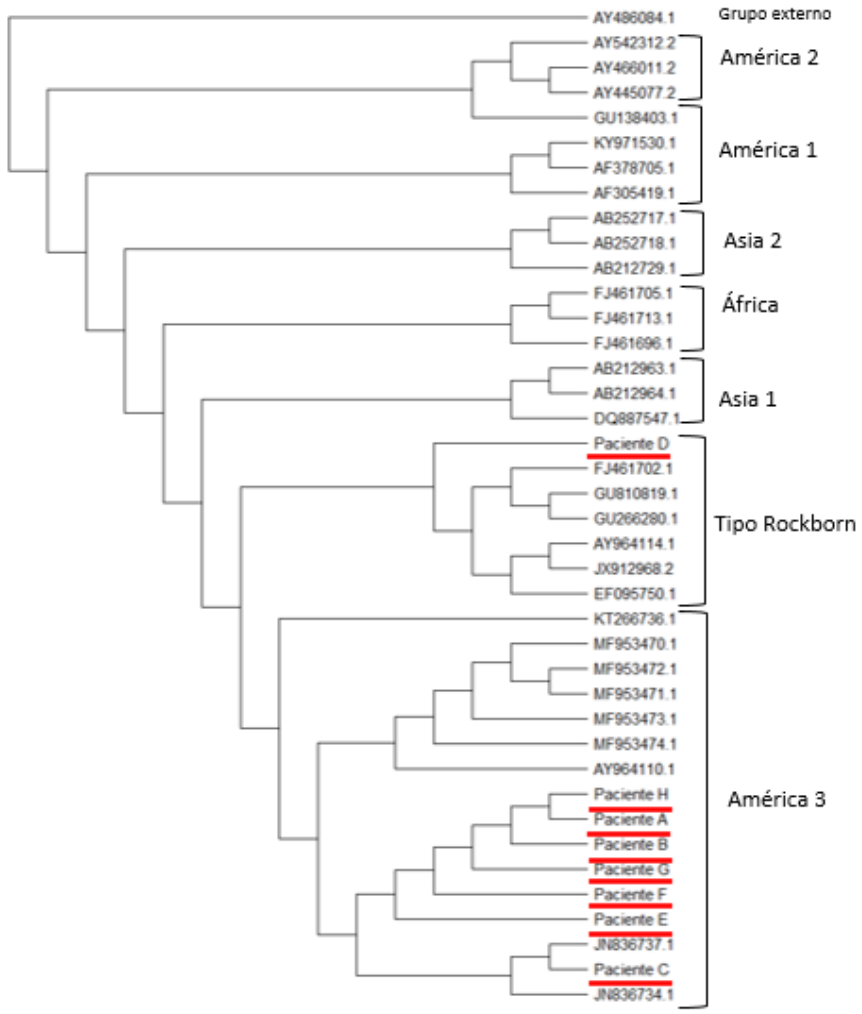


```
                  310        320        330
            ....|....|....|....|....|....|....|...
Onderstepoort DSIATWMVPALASEKQEEQKGCLESACQRKTYPMCNQA
Paciente A    ..........V........N.........S......T
Paciente B    ..........V........N.........S......T
Paciente C    ..........V........N.........S.....PT
Paciente D    ..MSHR....VV.......RK........S......T
Paciente E    ..........V........N.........S......T
Paciente F    .....R.....V........N.........S......T
Paciente G    ....NR.....V........N.........I......T
Paciente H    ..........V........N.........S......T
```

Anexo 6. Cladograma en base a la secuencia nucleotídica del gen *n* de los aislamientos de los ocho pacientes y aislamientos de cinco genotipos del virus del moquillo canino circulantes en el mundo disponibles en el Genbank. Se marcaron con rojo las secuencias de los ocho pacientes. La Cepa del virus del sarampión Edmonston-Zagreb fue utilizada como grupo externo (AY486084.1).



Anexo 7. Cladograma en base a la secuencia nucleotídica del gen *f* de los aislamientos de los ocho pacientes y aislamientos de ocho genotipos del virus del moquillo canino circulantes en el mundo en el mundo disponibles en el Genbank. Se marcaron con rojo las secuencias de los ocho pacientes. La Cepa del virus del sarampión Edmonston-Zagreb fue utilizada como grupo externo (AY486084).



Anexo 8. Cladograma en base a la secuencia nucleotídica del gen *h* de los aislamientos de los ocho pacientes y aislamientos de siete genotipos del virus del moquillo canino circulantes en el mundo en el mundo disponibles en el Genbank. Se marcaron con rojo las secuencias de los ocho pacientes. La Cepa del virus del sarampión Edmonston-Zagreb fue utilizada como grupo externo (AY486084).