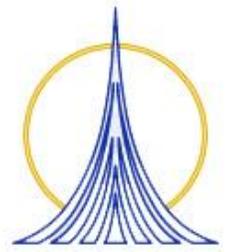




**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA**



**Caracterización Filogenética y Análisis Evolutivo del
Virus de Encefalitis Equina Venezolana utilizando
como marcador la Glicoproteína E2**

ÁREA: BIOLOGÍA MOLECULAR

Alumna. Hernández Durán Claudia Fernanda

Vo. Bo. **Director de Tesis.** Dra. María de Lourdes Muñoz Moreno
Departamento de Genética y Biología Molecular, CINVESTAV-IPN

Vo. Bo. **Asesor Interno. Biól.** José Misael Vicente Hernández Vázquez
UMIEZ, FES-ZARAGOZA-UNAM

10-09-2012

La presente tesis la dedico especialmente a mis **padres** ya que sin su apoyo este trabajo no hubiera sido posible, pero sobre todo por permitirme con su esfuerzo aventurarme en el mundo de la ciencia, gracias a ustedes puedo hacer algo tan apasionante como es la biología, los amo.

A mis hermanas **Kadi, Katia** y **Gabi** por estar siempre que las he necesitado y comprenderme en los momentos difíciles, ustedes son mi motor para seguir a adelante.

A **Natividad Arias** y **Rosario Durán** que aunque no estén con nosotros, porque recordar sus palabras me alienta a seguir y cada día tratar de ser mejor persona.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Edelmiro por instruirme a conocer el maravilloso mundo de la investigación, pero sobre todo por preocuparse en los momentos difíciles y ayudarme en todo momento para conocer algo tan apasionante como son los virus.

Al M.C. Adrián Rivera Solís ya que sin tu consejo seguramente no hubiera conocido el LBS-3 de la CPA, pero sobre todo por encontrar un amigo cuando más se necesita.

Al Biol. Vicente Hernández, por que más que un excelente profesor brindarme su amistad incondicional y no dejarme flaquear en los momentos críticos de este trabajo.

A todo el personal de la CPA, del cual aprendí no solo la importancia del diagnóstico si no también el verdadero valor de la amistad.

Muy especialmente al M.C. Lauro Velásquez Salinas ya que sin ti este trabajo no hubiera sido posible, por compartir tus ideas y conocimiento pero sobre todo por alentarme a seguir adelante y pensar que las cosas son posibles.

A la M.C. Belem Huerta, gracias Bel por apoyarme durante los experimentos en el laboratorio y tener paciencia durante el desarrollo de este trabajo,

A la M.C. Rosalba Gutiérrez gracias por enseñarme tantas cosas pero sobre todo por permitirme ser tu amiga, gracias maestra.

Al MVZ. Mario Solís y Pedro Paz Ramírez por permitirme trabajar en las instalaciones de la CPA para realizar este trabajo y apoyarme en todo momento.

A la Dra. María de Lourdes Muñoz Moreno por aceptarme en su laboratorio pero sobre todo por el apoyo para la finalización de este trabajo, gracias por su paciencia y comprensión durante esas largas discusiones.

A todos los integrantes del laboratorio 2 del Departamento de Genética del CINVESTAV, Erisel, Ángeles, Miriam, Willi, Ángeles, Ashael, Lalo, Itzel, Miguel, Rous, Mirna, Ever y Briseiri, gracias por sus consejos y críticas al presente trabajo, pero sobre todo gracias por brindarme su amistad desde el primer día que los conocí.

Muy especialmente a Dr. Gerardo Pérez Ramírez por compartir tus conocimientos, sobre todo por tu comprensión y apoyo, gracias a ti la evolución me pareció aún más interesante y un gran campo por estudiar, gracias por esas largas charlas que tanto me ayudaron a aterrizar mis ideas.

Gracias Sam por ser como un hermano y estar en los momentos más críticos por los que pude haber pasado, gracias por tu apoyo, por ser parte de esta aventura y permitirme ser parte de tu familia, gracias Sra. Lilia por ser como una segunda madre.

ÍNDICE

I. GLOSARIO

II. ÍNDICE DE TABLAS

III. ÍNDICE DE FIGURAS

IV. RESUMEN

1.	INTRODUCCIÓN	1
1.1.	Consideraciones históricas y generalidades del VEEV	1
1.2.	Clasificación taxonómica	3
1.3.	Patogénesis	4
1.4.	Características moleculares	5
1.5.	Efectos de la infección por VEEV	6
1.5.1.	En humanos	6
1.5.2.	Equinos	6
1.6.	Ecología y Distribución	7
1.7.	Vectores	9
1.8.	Diagnóstico e identificación del Agente	10
1.9.	Evolución del virus EEV	11
1.9.1.	Evolución en condiciones naturales	12
2.	Antecedentes directos del trabajo	13
2.1.	Planteamiento del problema	13
2.2.	Justificación	14
2.3.	Hipótesis	15
2.4.	Objetivos	15
2.5.	Estrategia experimental	16
2.6.	Material y métodos	17
2.6.1.	Obtención de muestras	17
2.6.2.	Diseño de los iniciadores	17
2.6.3.	Extracción del ARN	19

2.6.4.	Optimización de la RT-PCR para amplificar el gen E2.	19
2.6.5.	Purificación del producto de la amplificación	19
2.6.6.	Procedimiento de secuenciación	20
2.6.7.	Análisis filogenético	21
2.6.8.	Análisis de redes	21
2.6.9.	Análisis evolutivo	25
2.7.	Determinación de la presión selectiva	25
3.	RESULTADOS	26
3.1.1.	Expansión del virus en células VERO	26
3.1.2.	Estandarización de los métodos de RT-PCR	27
3.1.3.	Amplificación del gen E2 de aislados del VEEV	28
3.1.4.	Secuenciación automática del gen E2 del VEEV	29
3.2	Análisis Filogenéticos	30
3.2.1.	Relación de las cepas respecto a otros subtipos que circulan en América.	35
3.2.2.	Análisis subtipo IE con respecto a otros aislados circulantes en América	40
3.2.3.	Análisis de los aislados el 2011	40
3.2.4.	Análisis de redes todos los subtipos	41
3.2.5.	Análisis de redes IE fragmento	43
3.3	Análisis evolutivo	45
3.3.1.	Prueba de Tajima y presión de selección	46
3.3.2.	Comparación de la secuencia de aminoácidos	47
3.3.3.	Comparación de nucleótidos	48
3.3.4.	Matriz de identidad (UGENE)	49
3.3.5.	Encefalitis Equina Venezolana en México	51
4	DISCUSIÓN	52
5	CONCLUSIONES	56
6	SUGERENCIAS PARA FURTURO TRABAJOS	57
7	BIBLIOGRAFÍA	58
8	ANEXO	65

I. GLOSARIO

ADN: Abreviatura de Ácido desoxirribonucleico.

Alineamiento: Segunda fase en el ciclo de amplificación. A una temperatura particular dos hebras sencillas de ADN se complementan para formar una doble hélice.

Amplificación: La replicación exponencial de un fragmento específico de ADN de longitud específica que por medio de PCR produce múltiples copias.

ARN: Abreviatura de Ácido Ribonucleico.

Cápside: Es la cubierta proteica que rodea la zona central de ácido nucleico de un virus.

Cepa: Es un linaje de un agente etiológico que difiere en regiones específicas del genoma, pero que pertenece a la misma especie.

CPA: Comisión México-Estados Unidos para la prevención de la Fiebre Aftosa y otras enfermedades exóticas en Animales, organismo dependiente de SAGARPA, es uno de los laboratorios encargados de la vigilancia de enfermedades de tipo virales en animales en México.

Desnaturalización: Primera fase del ciclo de amplificación. El rompimiento de los puentes de hidrógeno entre las hebras de la molécula de ADN por calor, permite la separación de ellas en hebras simples.

EEV: La Encefalitis Equina Venezolana es una enfermedad que se presenta principalmente seres humanos y equinos, se caracteriza por un cuadro febril que en ocasiones va seguido de uno neurológico y la muerte.

Encefalitis: Enfermedad caracterizada por la inflamación del encéfalo, debida a infecciones provocadas por distintos agente etiológicos entre ellos bacterias, hongos y virus.

Enzoótica: Se considera este término cuando existen casos de una infección que se produce en forma constante en los seres humanos o animales de una región determinada estando permanentemente afectadas.

Epizoótico: Relativo a epizootia

Epizootia: Indica un aumento rápido en los niveles de infección o número de casos en una población esto específicamente en animales y es el equivalente a lo que consideramos una epidemia en los humanos.

Extensión. Tercer y última fase del ciclo de amplificación. La polimerasa se extiende desde la primera en dirección 5' a 3', replicando la hebra de ADN.

Número de acceso: Código alfanumérico proporcionado por una base de datos como identificador para una secuencia individual de ADN

OIE: Es la Oficina Internacional de Epizootias que pertenece a la Organización Mundial de Sanidad Animal y es el máximo órgano regulatorio a nivel mundial respecto a la situación de sanidad animal.

RT-PCR: Es el proceso de amplificación de ARN en donde la hebra es retrotranscripta en ADNc (Acido Desoxirribonucleico complementario), utilizando para ello la enzima transcriptasa reversa, la técnica es parecida a la PCR convencional.

Subtipo: Subdivisión de poblaciones de una especie, variantes antigénicas que se reconocen sobre la base de ensayos de neutralización del efecto citopático.

SuperScript™ One-step RT-PCR whit Platinum® Taq: Kit en donde la mezcla de enzimas permite la detección y análisis de ARN por medio de la reacción de reverso transcriptasa ligada a la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR), la cual se lleva a cabo en un solo tubo. Presenta tres componentes: SuperScript™ II RT/ Platinum®, Taq Mix y la mezcla de la reacción 2X, sistema amortiguador con las condiciones óptimas de Mg²⁺, desoxinucleótidos y estabilizadores.

VEEV: El Virus de Encefalitis Equina Venezolana es un virus ARN de polaridad positiva, que pertenece al género *Alphavirus* de la familia *Togaviridae*.

Virulencia: Es el grado de patogenia que posee un microorganismo en función de la gravedad de las lesiones que provoca y de la capacidad que posee para invadir nuevos tejidos.

World Health Organization: Organismo oficial mundial de referencia en las estadísticas epidemiológicas y el control de enfermedades infecciosas en el mundo WHO

II. ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I.-	Tipificación del Complejo Encefalitis Equina Venezolana.....	3
Tabla II.-	Iniciadores diseñados para la amplificación y secuenciación de la glicoproteína E2.....	18
Tabla III.-	Secuencias utilizadas para el análisis filogenético del VEEV.....	22
Tabla IV.-	Secuencias utilizadas para el análisis filogenético del subtipo IE del VEEV...	24
Tabla V.-	Estimación de Máxima Verosimilitud compuesto del patrón de sustitución de nucleótidos.....	45
Tabla VI.-	Prueba de neutralidad de Tajima.....	46
Tabla VII.-	Resumen de los cambios de aminoácidos consistentes entre los genotipos del subtipo IE del VEEV.....	48
Tabla VIII	Cambios de nucleótido entre las secuencias de Veracruz y Tabasco aisladas en 2011 y la cepa 63U16.....	50
Tabla IX.	Matriz de identidad entre secuencias de nucleótidos para el subtipo IE.....	51

III. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.-	Mapa la Encefalitis Equina Venezolana en México.....	1
Figura 2.-	Morfología del virus de Encefalitis Equina Venezolana.....	5
Figura 3.-	Genoma del Virus de Encefalitis Equina Venezolana.....	5
Figura 4.-	Ciclos biológicos de la Encefalitis Equina Venezolana.....	8
Figura 5.-	Árbol Filogenético construido con el método de máxima verosimilitud.....	12
Figura 6.-	Diseño de oligonucleótidos para amplificación de la glicoproteína E2.....	18
Figura 7.-	Expansión del virus en cultivo celular.....	26
Figura 8.-	Gradientes para definir la temperatura de alineamiento de la RT-PCR.....	27
Figura 9.-	Amplificación de la glicoproteína E2 del Virus Encefalitis Equina Venezolana de aislados de equinos del 2011 de Veracruz y Tabasco.....	28
Figura 10.-	Árbol Filogenético por Máxima Verosimilitud usando el Gen E2 del VEEV	31
Figura 11.-	Árbol Filogenético por método de Bayes usando el Gen E2 del VEEV.....	32
Figura 12.-	Árbol Filogenético utilizando Hyphy usando el Gen E2 del Virus de Encefalitis Equina Venezolana	33
Figura 13.-	Árbol Filogenético elaborado con Hyphy usando el Gen E2 del Virus de Encefalitis Equina Venezolana.....	34
Figura14.-	Árbol Filogenético elaborado con Hyphy para el subtipo IE usando el Gen E2 del Virus de Encefalitis Equina Venezolana.....	37
Figura 15.-	Árbol Filogenético elaborado con Hyphy para el subtipo IE usando el Gen E2 del Virus de Encefalitis Equina Venezolana.....	38
Figura 16.-	Árbol Filogenético elaborado con Hyphy para el subtipo IE usando el Gen E2 del Virus de Encefalitis Equina Venezolana	39
Figura 17.-	Linajes del subtipo IE.....	41
Figura 18.-	Red filogenética del VEEV incluyendo todos los subtipo.....	42
Figura 19.-	Red filogenética del Virus de Encefalitis Equina Venezolana para el subtipo IE.....	43
Figura 20.-	Ubicación de los tres linajes del subtipo IE.....	51
Figura 21.-	Casos recientes de Encefalitis Equina Venezolana en México.....	52

IV. RESUMEN

El Virus de Encefalitis Equina Venezolana (VEEV) se distribuye en zonas tropicales y subtropicales de América con mayor persistencia en la parte sur y centro, y es responsable de causar enfermedades sistémicas febriles que en ocasiones llegan a afectar al Sistema Nervioso Central (SNC) causando la muerte principalmente en equinos y humanos. La transmisión de este virus es provocada por mosquitos de varias especies el más importante *Culex melanoconion*. En este trabajo se realizó el análisis evolutivo y filogenético del VEEV de muestras aisladas en equinos enfermos, de los estados de Veracruz y Chiapas en el año 2011. Los virus se aislaron en células VERO y fueron tipificados mediante RT-PCR, posterior a ésto se secuenció el gen E2 para su análisis. El análisis filogenético mostró que se trata del subtipo IE, el cual está estrechamente ligado con las cepas que se encuentran dentro del linaje de las Costas del Golfo de México en donde se observa una divergencia de menos del 1 %. Asimismo la reconstrucción filogenética muestra una estrecha evolución con cepas aisladas en el 2008 que a su vez se relacionan estrechamente con la cepa 63U16 aislada en el año 1963. El análisis de las secuencias de aminoácidos no mostró cambios sustanciales, a excepción de la cepa MX08-56 en donde se observa un cambio en el aminoácido en la posición 357 de T→K. Los valores de la relación entre las mutaciones no sinónimas y mutaciones sinónimas (DN/DS) fue de 0.115948 lo que indica que la selección es negativa y es una de las principales fuerzas evolutivas actuando sobre este virus, favoreciendo así la preservación de los fenotipos mejor adaptados en las zonas endémicas, lo que ayuda a explicar la estabilidad del linaje por 48 años. Por lo anterior se sugiere que de los casos del 2011 representan una reemergencia del virus aislado en 1963, el cual fue aislado en el estado de Chiapas, los análisis realizados con la glicoproteína E2 no muestran cambios sustanciales que expliquen la infección de carácter neurotrópico en forma severa en los equinos del estado de Tabasco y Veracruz, sin embargo, es posible que el incremento en la virulencia se deba a cambios en otras regiones del genoma o que el sistema inmune del animal no haya estado en óptimas condiciones, o la carga viral se vio aumentada debido a una capacidad mayor de transmisión del virus por parte del vector. Los casos positivos registrados por la CPA coinciden con las temporadas de lluvias siendo de Septiembre a Noviembre cuando se incrementan las poblaciones de mosquitos.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Consideraciones históricas y generalidades del VEEV

El Virus de Encefalitis Equina Venezolana (VEEV) es un virus zoonótico, es decir que puede afectar al hombre además de otras especies animales y por lo tanto es de vigilancia y declaración obligatoria para la Organización Internacional de Epizootias (OIE). Es una enfermedad que ataca principalmente a equinos y otros mamíferos entre ellos al hombre; se considera como una enfermedad febril, que algunas veces se refleja en un cuadro neurológico y en los casos más severos causa la muerte del individuo (**Vargas et al.**, 2009). El VEEV, fue aislado y reconocido por primera vez en Venezuela en 1938 por Beck y Wickoff y por otro lado por Kubes y Ríos (1939). Se consideraba que el virus era propio de Sudamérica, hasta que a partir de 1962 se encontraron individuos con anticuerpos en zonas del sur de México (Figura 1) (**Zarate**, 2006).

DESCRIPCIÓN DE LOS PRIMEROS CASOS DE ENCEFALITIS EQUINA VENEZOLANA EN MÉXICO



Figura 1. Mapa la Encefalitis Equina Venezolana en México. Se observa la distribución espacio temporal del Virus de Encefalitis Equina Venezolana en México, desde su primera aparición en 1962 donde se detectaron anticuerpos contra la enfermedad en Campeche, la epizootia más severa que abarco de 1969 a 1972 hasta los registro de 1996 (**Morilla**, 2007).

Entre 1962 y 1973, con excepción de 1965, ocurrieron brotes todos los años, siendo la onda epizootica más importante en 1969, la cual se difundió de Ecuador a Guatemala y más tarde a El Salvador, Honduras y Nicaragua, extendiéndose en 1970 a los países de Centroamérica, hasta llegar en junio de 1971 al estado de Texas, en los Estados Unidos de Norteamérica (**Navarro et al.**, 2005). Durante esos dos años la epidemia recorrió un territorio de 4,000 km, causó decenas de miles de casos en humanos aproximadamente 34,630; en equinos produjo una gran mortalidad, donde fallecieron de 38,000 a 50,000 equinos lo cual provocó una gran pérdida económica. Esta epizootia fue provocada por el subtipo IAB, el cual ya no se ha aislado nuevamente.

En Ecuador se notificaron cerca de 30,000 casos en personas con 310 muertes, en Colombia 200,000, en Venezuela 2,630 casos con 143 casos neurológicos y 14 muertes en humanos y en México se presentaron 2,000 casos en humanos y más de 8,000 equinos muertos (**Oletta et al.**, 2010). En México el primer registro de la presencia del virus se hizo el año de 1962, desde esa fecha se han presentado casos recurrentes de la enfermedad provocados principalmente por los subtipo IC y IE predominando este último (**Li.**, 2010). En 1965 se presentó el deceso de una persona en el municipio de Jaltipan, Chiapas aparentemente provocada por encefalitis ya que en ese momento no se realizó un diagnóstico diferencial; en 1966 ocurrió una epizootia que afectó al Estado de Tampico. Poco después se registró el primer caso oficial en el municipio de Chico-Musuelo, Chiapas; el virus aislado pertenecía al subtipo IAB. Durante la epizootia registrada de 1969 a 1972 en México y sus países vecinos (Colombia, Venezuela, Perú, Ecuador, Salvador, Guatemala, Honduras, Nicaragua, Costa Rica y Estados Unidos) se tuvieron grandes afectaciones tanto de salud como económicas, en especies como equinos, mulas, asnos y en humanos, afectando a más del 70 % del territorio mexicano esto es 51,137 personas afectadas, con 93 defunciones y 49,309 equinos muertos con 1400 reportes de laboratorio. De 1970 a 1976 se vacunaron 16 800 000 equinos lo que implicó un gran costo tanto económico como de vidas (**Villareal**, 2007), es evidente que el costo de vidas humanas o de equinos es mucho más alto que el económico.

1.2. Clasificación taxonómica y tipificación del complejo VEEV

Basándonos en datos de la clasificación de Baltimore y datos del Comité Internacional de Taxonomía del Virus (ICTV), el VEEV pertenece al grupo IV es un virus de ARN de cadena sencilla en sentido positivo que pertenece al Orden de los Arbovirus, Familia *Togaviridae*, Genero *Alphavirus* (**Kubes y Ríos** 1939; **Beck y Wickoff**, 1938), y es una de las especies que conforma el complejo Encefalitis Equina Venezolana (**Aguilar et al.**, 2011).

Las variantes que forman el complejo taxonómico del VEEV, se clasifican según sus características antigénicas, exhibición de comportamiento biológico, distribución geográfica y características en patogenicidad dividiéndose en subtipos enzoóticos que circulan en regiones específicas de América y no desarrollan cuadros severos de la enfermedad, y epizooticos que afectan a diferentes especies provocando cuadros neurológicos y circulan en diferentes regiones de América. En el subtipo I encontramos la cepas epizooticas que corresponden a las variante IAB y IC, las cepas enzoóticas corresponden a las variantes ID y IE, así como las especies que pertenecen a los subtipos IF, II, III, IV y V (Tabla I) (**Rodríguez y Boshell** 1995; **Oletta y Carvajal**, 2010).

Tabla I. Tipificación del Complejo Encefalitis Equina Venezolana

Especie	Subtipo Antigénico	Variante Antigénica	Ciclo	Región
VEEV ¹	EEV ² -I	AB	Epizootodémico	Norte, Centro y Sur de América
		C	Epizootodémico	América del Sur
		D	Enzoótico	América del Sur, Panamá
		E	Enzoótico	Centro de América, México
Mosso das Pedras		F	Enzoótico	Brasil
Everglades	EEV-II		Enzoótico	Sur de Florida (USA)
Mucambo	EEV-III	A	Enzoótico	América del Sur, Trinidad
		C (cepa71D1252)	Enzoótico	Perú
		D	Enzoótico	Perú
Tonate	EEV-III B		Enzoótico	Brasil, Colorado (USA)
Pixuna	EEV-IV		Enzoótico	Brasil
Cabassou	EEV-V		Enzoótico	Guyana Francesa
Rio Negro	EEV-VI		Enzoótico	Argentina

Aguilar et al., (2011).

1. Virus de Encefalitis Equina Venezolana (VEEV)

2. Encefalitis Equina Venezolana (EEV)

1.3. Patogénesis

El VEEV pertenece a la familia de los Arbovirus, los cuales son característicos por su transmisión a través de artrópodos hematófagos más específicamente insectos, se sospecha que también los jevenes cerapotogonidos pueden participar en la transmisión del virus, una vez infectado el artrópodo pasa posteriormente a los vertebrados por medio de una picadura (generalmente de mosquitos); siendo así los vertebrados buenos amplificadores del virus (**Gámez**, 2005). Como ya se mencionaba el VEEV entra a la célula, posterior a la picadura del mosquito, continua la replicación lenta del virus en el punto de entrada y o en los ganglios regionales, provocando bajos niveles de viremia en donde se puede presentar fiebre, los virus se diseminan por los nódulos linfáticos y vasos sanguíneos a otros tejidos, y en el caso de las cepas virulentas presentan efecto linfotóxico, éste continua multiplicándose en las células hematopoyéticas produciendo así los viriones en 24 horas, los cuales llegan a la sangre, etapa en la que se producen los síntomas generales. Tanto los humanos como los equinos producen una respuesta humoral en donde comienzan a producir anticuerpos neutralizantes inhibidores de la hemoaglutinación y fijadores del complemento, lo que se puede detectar a partir de los siete días posteriores a la infección (**Morilla**, 2007). La respuesta humoral se inicia cuando los virus interactúan con los linfocitos; y cuando la infección llega al SNC, se produce la replicación del virus lo cual causa la destrucción celular. Si esta infección no logra llegar al cerebro, se genera una infección asintomática o febril generalizada sin encefalitis (**Zarate**, 2006).

El mecanismo de entrada del virus al cerebro no está completamente definido, se ha sugerido que esto ocurre tanto por el endotelio capilar así como a través del líquido cefalorraquídeo (LCR), lo que ocurre a través de moléculas de adhesión; previa invasión del plexo coroideo, una vez en éste, invade el SNC donde es destruido o permanece retenido en él, pero no retorna a la circulación (**Sharma et al.**, 2011). Es importante mencionar que en condiciones de laboratorio se ha demostrado el contagio por vía aérea a través de los canales de respiración y endovenosa, también existe la infección transplacentaria (**Laguna et al.**, 2000). Debido a todo esto, sería muy importante realizar más estudios en referencia a todos los mecanismos de entrada del virus a sus hospederos tanto los vertebrados como el mosquito vector.

1.4. Características moleculares

El virión tiene un tamaño aproximado de 65 a 75 nanómetros (**Morilla, 2007**). Está conformado por una nucleocápside icosaédrica rodeada por una envoltura lipídica, la cual en su superficie contiene una serie de proyecciones entramadas entre sí que corresponde a glicoproteínas y se encuentran formando trímeros (**Parker et al., 2010**) (Figura 2).

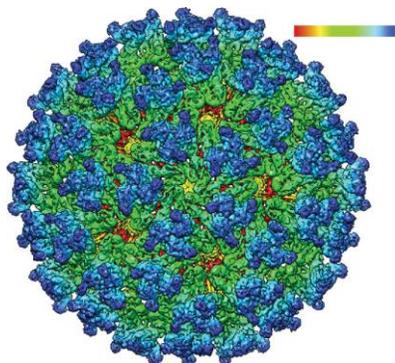


Figura 2. Morfología del Virus de Encefalitis Equina Venezolana. Se observan la estructura del virus, en su superficie se encuentran las proteínas estructurales formando trímeros (**Zhang et al., 2011**).

La conformación estructural de los *Alphavirus* se caracteriza por una cadena de sentido positivo de ARN (Ácido ribonucleico) de aproximadamente 12 kilobases (**Weaver et al., 1994, Hesse et al., 1995**). El genoma se conforma por cuatro proteínas no estructurales denominadas como nsP1, nsP2, nsP3 y nsP4 en un sentido 5' a 3' que están involucradas en el proceso de replicación viral, posterior a éstas se encuentran los genes que codifican para la cápside, por último están las proteínas estructurales o glicoproteínas (Figura 3), las cuales son responsables del reconocimiento de receptores de membrana y fusión con células dianas, en proyecciones forman dímeros E1/E2 y trímeros E1/E2/E3, la función de la glicoproteína E2 es importante ya que el ectodominio es responsable de la unión de receptores celulares, cabe mencionar que entre la glicoproteína E2 y E3 se encuentra un ARN subgenómico llamado 26S (**Zhang et al., 2011**).

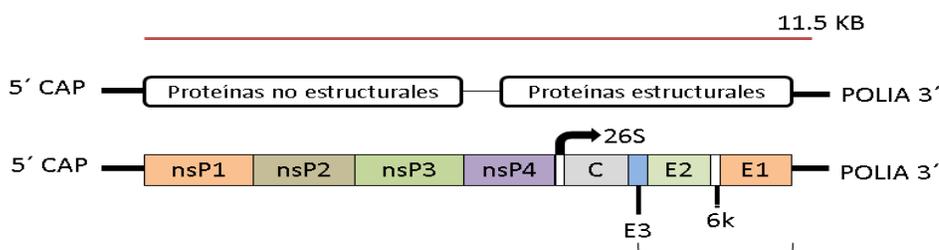


Figura 3.- Genoma del Virus de Encefalitis Equina Venezolana. Codifica para nueve proteínas, las cuatro primeras son no estructurales denominadas como NSP1 a NSP4, posteriormente se encuentra la proteína que codifica para la cápside y después se encuentran las proteínas estructurales denominadas glicoproteínas E3, E2 y E1 (**Vargas, 2009**).

1.5. Efectos de la infección por VEEV

Las infecciones por Arbovirus generalmente se presentan como enfermedades febriles inespecíficas, tales como fiebre, artralgias y erupciones así como infección del SNC, por esta signología es difícil realizar un diagnóstico diferencial e inclusive al no realizarse este suele confundirse con otras enfermedades como dengue e inclusive influenza (**Laguna et al.**, 2000, **PHAO** 2010). Algunas de las características específicas de la enfermedad por VEEV son:

1.5.1. Humanos

En el VEEV se ha observado que en personas menores a quince años, el periodo de incubación es de 1.5 a 3.5 días, en este caso el cuadro clínico es parecido a infecciones en las vías respiratorias esto es un estado gripal, inyección conjuntival y faringitis leve, con fiebres superiores a 40°C, entre los síntomas, hay dolor de cabeza, catarro, mialgias, nauseas, vómitos, astenia y dolores musculares. Estos síntomas se pueden mantener durante tres o seis días, después viene la recuperación; en algunos casos existen síntomas neurológicos que es la fase más crítica ya que se pueden presentar síntomas como rigidez de nuca, delirio, convulsiones, parálisis de nervios craneales, nistagmos, reflejos patológicos, parálisis espástica, desviación en los ojos y en algunos casos la muerte (**Aguilar et al.**, 2011; **Morilla**, 2007). En sangre periférica se presenta leucopenia, acompañada de neutropenia trombocitopenia leve durante los primeros dos días

1.5.2. Equinos

En los equinos se desarrolla una enfermedad bifásica en donde primeramente hay multiplicación viral en tejido no neuronal, que dura aproximadamente tres días y en la segunda fase aparece clínicamente la encefalitis, estas fases pueden definirse o traslaparse (**Laguna**, 2000). Hay ciclos febriles a las 24 horas de infección que puede perdurar alrededor de 7 días, presentando temperaturas que van de los 40°C a 42°C acompañadas de disminución en el requerimiento diario de alimento, hay una elevada sensibilidad, alteraciones de la visión y ceguera, algunas veces hay depresión del SNC. Se presenta leucopenia de tres a cinco días, donde se observa que disminuyen los niveles de neutrófilos

y linfocitos, hematocritos y plaquetas. En este caso ocurre viremia con altos títulos, con una duración de aproximadamente 120 horas (**Morilla, 2007**).

1.6. Ecología y Distribución

Este virus es enzoótico de bosques húmedos tropicales y zonas pantanosas de Centroamérica, América del sur, Trinidad y Tobago. Específicamente en la zona septentrional y Occidental de América del Sur se manifiesta en formas de epizootias (**Walton and Suchman, 2010**). La enfermedad es endémica en la parte norte de América del Sur, en Trinidad y en América Central, y en algunos años (1970-1971) incluso se ha extendido a Estados Unidos (**Brault et al., 2001**).

El VEEV en su tipo epizoótico (término que se utiliza para describir afectaciones constates en animales equivalentes a una epidemia) es característico de zonas de Sudamérica aunque también se encuentran circulantes cepas enzoóticas (cepas virales que se producen en forma constante en los seres humanos o animales de una región determinada), para el caso específico de éstas últimas preferentemente se encuentran en Centroamérica, (**Restrepo, 2000**). El virus circula regularmente en regiones delimitadas por climas tropicales, pero se ha encontrado también en zonas con otros climas (**Campero, 2007**). El VEEV tiene dos vías de replicación, enzoótico y epizoótico. Este último provoca enfermedad grave en humanos y equinos que en muchos casos llega a ser fatal (**Garmashova et al., 2007; Aguilar et al., 2011; Paessler et al., 2006**).

El ciclo enzoótico ocurre cerca de las costas en zonas con poca elevación, en regiones tropicales, subtropicales y con lluvias estacionales (**Morilla, 2007**). Los virus enzoóticos aislados se han encontrado en áreas boscosas húmedas, así como cerca de pantanos o reservorios permanentes de agua. En este ciclo la diseminación de los focos no es mayor a una hectárea, mostrando un comportamiento cíclico y en algunas épocas del año permanece ausente. Este ciclo se da entre pequeños mamíferos y mosquitos de forma natural, los principales hospederos son roedores de los géneros: *Sigmodon*, *Oryzomys*, *Zigodontomys*, *Heteromys*, *Peromyscus* y *Proechimys*. Entre los vectores se encuentran mosquitos de los géneros, *Aedes*, *Psorophora* entre otros, siendo el principal vector el

mosquito *Culex melanoconion* aunque no es la única especie de este género que participa como vector (Aguilar *et al.*, 2011).

El VEEV de tipo enzoótico se considera endémico de algunas zonas de México, la circulación se da en: Chiapas, Oaxaca, Tabasco, Veracruz y Tamaulipas, dentro de este ciclo el subtipo IE es el predominante. En México se han encontrado tres linajes correspondientes al subtipo IE los cuales son: el de las costas del Pacífico de México y parte de América central, el Golfo y Atlántico por último las del oeste de Panamá. Cada una de éstas circulando de manera independiente manteniéndose desde 1960 (Aguilar *et al.*, 2011).

En el ciclo epizoótico se observa que tiene una amplia distribución en la naturaleza, los focos registrados se encuentran en zonas cercanas a las costas pero por encima del nivel del mar llegando a los 2,350 metros sobre el nivel del mar, este se presenta regularmente en climas variados y en lugares con baja precipitación pluvial. En este caso probablemente los equinos son amplificadores específicos; generando así su rápida diseminación, ya que en estas especies se han encontrado altos niveles de virus en sangre, por lo que se infiere que muy probablemente otros artrópodos hematófagos pudieran estar participando como vectores mecánicos provocando epidemias (Navarro *et al.*, 2005). Este ciclo se asocia a los subtipo IC e IAB, y los principales vectores son mosquitos pertenecientes a las especies: *Psorophora Columbia*, *Psorophora confinnis*, *Aedes sollicitans taeniorhynchus*, *Mansonia indubitans*, *Deinocerites pseudus* (Aguilar *et al.*, 2011).

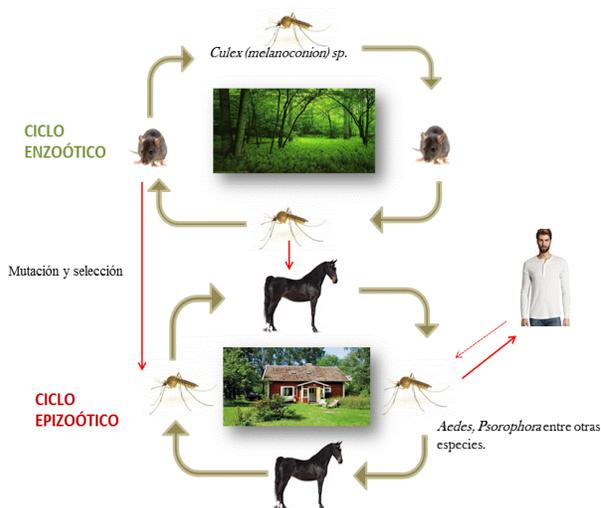


Figura 4.- Ciclos biológicos de la Encefalitis Equina Venezolana. Se muestran los dos ciclos biológicos que ocurren en el complejo Encefalitis Equina Venezolana que incluyen el ciclo enzoótico y el ciclo epizoótico (Aguilar *et al.*, 2011).

1.7. Vectores

Se ha reportado que existen varias especies de insectos hematófagos que actúan como vectores eficientes del VEEV. Específicamente en los arbovirus se han determinado bajas tasa de infección para los vectores siendo menores al 1% y la infección en artrópodos vectores, va a depender en gran medida de factores como la viremia del vertebrado, el establecimiento de la infección en el intestino del mosquito así como la temperatura ambiente (**Mesa et al.**, 2005). La abundancia y variedad de los vectores dentro del bosque, garantizan el mantenimiento y la transmisión de las cepas enzooticas del complejo de EEV. En el caso de las cepas enzooticas de la EEV estas se mantienen por un vector muy eficiente como es el *Culex (Melanoconion) spp.*, que es propio de las áreas húmedas, lluviosas y selváticas y tiende a concentrarse en el interior del bosque, teniendo una gran actividad nocturna (**Deardorff et al.**, 2011; **Boshell et al.**, 1999; **Ferro and Boshell.**, 1997).

Aunque también se ha logrado aislar el virus de otras especies como *Culex (Melanoconion) pedroi*, *Culex (Melanoconion) adamesi*, *Culex (Melanoconion) vomerifer*, *Culex (Melanoconion) spissipes*, *Ochlerotatus serratus* y *Ochlerotatus fulvus*. Es importante tomar en cuenta que no todos los vectores considerados susceptibles son capaces de transmitir el virus, especialmente dentro del ciclo enzoótico (**Mesa et al.**, 2005).

En al caso de las cepas epidémicas o epizooticas del VEEV se han aislado de 34 especies diferentes pertenecientes a 8 géneros distintos, donde una o más puede predominar como transmisores de la infección en una zona determinada. Las principales especies de mosquitos que se involucran en el ciclo de transmisión de las variantes epizoótica IAB y IC son *Aedes scutellaris*, *Ochlerotatus serratus*, *Ochlerotatus taeniorhynchus*, *Psorophora confinnis*, *Mansonia tittilans*, *Mansonia indubitans*, *Deinocerites pseudus* y *Anopheles aquasalis* (**Reinert et al.**, 2000). Sin embargo no se descarta que otras especies de mosquitos y de insectos hematófagos estén involucrados en la rápida diseminación del virus durante las epizootias a ser vectores eficientes del virus (**Mesa et al.**, 2005). En el caso específico de México el hecho de que mosquitos pertenecientes al género *Culex* predominen en regiones tropicales y subtropicales ayuda al mantenimiento del subtipo IE enzoótico del VEEV, en donde ocasionalmente los casos esporádicos y algunas epizootias como es el caso de la epizootia de 1996 en los estados de Oaxaca y Veracruz se asociaron

a un incremento de la población de vectores en la época de lluvias (**Aguilar et al.**, 2011), siendo así de suma importancia el control y en ocasiones la erradicación de algunas especies de mosquitos, en donde el aumento en la poblaciones de este puede traer consigo graves problemas de salud pública.

1.8. Diagnóstico e identificación del Agente

Para la identificación y diagnóstico confirmativo del VEEV se utilizan diversas técnicas en las cuales se incluyen pruebas de biología molecular, serología y aislamiento viral; siendo la última la más adecuada aunque también se puede realizar por medio de Inmunofluorescencia (IF) directa e histología. Aunque el virus puede obtenerse de varios órganos como son cerebro, corazón, hígado, bazo, ganglios linfáticos, timo, adrenales, médula ósea, pulmón, riñón (**Morilla**, 2007). Las muestras más adecuadas para el aislamiento son muestras sanguíneas obtenidas en el periodo altamente virémico, éste es, al comienzo de los signos clínicos (**OIE**, 2012). Para lo cual la suspensión de las muestras es inoculada vía intracerebral en ratones lactantes de entre uno y cuatro días de nacidos ya que posterior a los diez días de nacidos los ratones son menos susceptibles a la enfermedad. El VEEV es de fácil replicación en cultivos celulares sobretodo células de riñón de mono verde africano (VERO), riñón de cría de hámster BHK-21, células de riñón de conejo RK-13 así como fibroblastos de embrión de pollo. Las técnicas de biología molecular son ampliamente utilizadas en la detección de enfermedades virales, donde se usan técnicas como la RT-PCR que consiste en la transcripción reversa a partir del ARN viral dando como resultado la cadena complementaria (ADNc) (**Wang**, 2006); en este caso se utilizan cebadores específicos de regiones conservadas (**Gámez**, 2005). Esta última parece ser la técnica más sensible y rápida para la identificación del agente etiológico, sin embargo el aislamiento en líneas celulares permite realizar estudios de caracterización biológica entre otros para cepas de nuevos aislados del virus (**Pisano et al.**, 2011). Otras pruebas útiles son la seroconversión, fijación del complemento, inhibición de la hemaglutinación, neutralización por reducción de placas (PRN) o inmunofluorescencia directa empleando anticuerpos monoclonales (**OIE**, 2012). Los anticuerpos monoclonales reconocen específicamente un epítopo de la glicoproteína del VEEV. Es monoclonal porque todos son

idénticos y se generan a partir de una sola célula del sistema inmune generada a partir de un linfocito B y una célula tumoral (**Vallina** 2004).

1.9. Evolución del virus EEV

Los virus de ARN tienen valores altos de tasas de divergencia, esto debido a que los virus no tienen un sistema de reparación de los errores debidos a la polimerasa, haciendo que éstos acumulen mutaciones de forma rápida. La energía libre de discriminación permite una discriminación de 10^{-4} a 10^{-5} durante la síntesis de ARN. Aunque las podemos considerar como tasa medias de mutación, parece que hay ejemplos bien establecidos donde la tasa es más alta como 10^{-3} o más baja como 10^{-7} a 10^{-8} esto para nucleótidos específicos en el genoma de los *Alphavirus*. Aunque los *Alphavirus* tienen un gran potencial para tener una rápida divergencia, las tasa reales de esta medida son bajas en comparación a otros virus (**Hesse et al.**, 1988). Ejemplo de esto es un virus de VEEV aislado en el principio de una epidemia y al final de ésta durante 11 meses, el cual se diseminó por la región del Pacífico al ser analizado el genoma mostró una diferencia de 1 nt (nucleótido) en un fragmento de 1600 nt secuenciados, de los cuales 1200 correspondían a la glicoproteína E2 y 400 nt a la región no traducida en sentido 3', la velocidad media del cambio durante la epidemia fue de 10^{-4} /nt/año, con respecto a estos datos se sugiere que la tasa de divergencia respecto al genoma completo pudiera ser inferior, ya que se planteó como hipótesis que el cambio nucleotídico que se observó, podría haber sido seleccionado por el cambio de hospedero vertebrado que se produjo durante la epidemia. (**Strauss and Strauss**, 1994). Datos de la secuenciación del genoma del VEEE (Virus de Encefalitis Equina del Este) que fue aislado en diferentes lugares por un largo periodo mostró una tasa de divergencia de aproximadamente 10^{-4} /nt/año; y a partir de estudios de oligonucleótidos específicos las tasas de divergencia para EEV y WEE (Encefalitis equina del Oeste) se estimaron en 5×10^{-4} y 3×10^{-4} /nt/año, respectivamente. Hasta ahora los estudios mencionados indican que las tasa de divergencia para los *Alphavirus* tiene valores de 1×10^{-3} a 6×10^{-4} /nt/año, lo que contrasta con las tasas de divergencia de 10^{-2} /nt/años que se han encontrado en otros virus de ARN (**Weaver et al.**, 1992).

Muy posiblemente la tasa de divergencia de los *Alphavirus* se deba en gran medida a la exigencia de las condiciones de sus hospederos y la alternancia, esto es crecimiento en un hospedero artrópodo a temperaturas relativamente bajas y el de los vertebrados de

temperaturas superiores a 37°C. En este caso podemos considerar que el virus debe de estar altamente adaptado a persistir en ciertos hospederos, ya que si se considerará un nuevo hospedero esto podría reflejarse muy posiblemente en altas tasas de divergencia (Strauss and Strauss, 1994).

1.9.1. En condiciones naturales

En el complejo VEEV los cambios evolutivos más estudiados son en las cepas de tipo epizootico, específicamente los subtipos IAB y IC. Existen cinco teorías para explicar la evolución de éstas, una de ellas menciona la aparición de epizootias a partir de progenitores enzoótico, esto se evidenció a partir de estudios antigénicos y secuenciación en donde se describe similitud entre los virus IC e ID (Powers *et al.*, 1997, Wang *et al.*, 1998). Un total de 15 diferencias de aminoácidos se identificaron entre el ID y cepas de IC, dos de estos cambios correspondían a la glicoproteína E2, que es la que se considera contiene el motivo de patogenicidad y amplificación potencial en equino (Greene *et al.*, 2005). Se observó una sustitución de aminoácidos de Thr a Lys en la posición 213 de la glicoproteína E2 que era suficiente para transformar el fenotipo de viremia en el equino, de esta forma se proporcionó una fuerte evidencia de la aparición de un virus epizootico de progenitores enzoóticas (Anishchenko *et al.*, 2006). Se requieren estudios adicionales para investigar qué cambios en otras cepas de tipo enzoótico generarán cepas epizooticas. Por lo que respecta a las cepas enzoóticas, éstas posiblemente sufren menos variaciones en su genoma con respecto al tiempo debido al tipo de ciclo, sin embargo es interesante observar que esta hipótesis se mantenga ya que un ejemplo de esto es el subtipo IE que como podemos ver en la figura 5, muestra tres linajes los cuales se han mantenido circulando de forma constante en Panamá, México y Guatemala (Aguilar *et al.*, 2011).



Figura 5. Árbol Filogenético construido con el método de máxima verosimilitud. Se distingue la formación de tres linajes que están conformando a la variante IE del complejo del Virus de Encefalitis Equina Venezolana, los tres linajes son las cepas que pertenecen a Panamá, la costa del Pacífico y la costa del Golfo de México.

2. ANTECEDENTES DIRECTOS DEL TRABAJO

Datos de Weaver y Barret del 2005, enfocados en la caracterización molecular y evolución de los aislados del VEEV, sugieren aspectos evolutivos importantes con respecto a la glicoproteína E2. Estos trabajos están más enfocados a los tipos epizoóticos ya que analizan el posible origen de este tipo de las cepas; se han encontrado evidencias de que los tipos enzoóticos específicamente el ID podrían ser precursores de las cepas del tipo I-C de carácter epizoótico. Aunque aún no hay estudios de que cambios en el genotipo de otras variantes enzoóticas se involucren con este fenómeno, de aquí que se comenzará la realización de estudios más específicos de las Glicoproteínas estructurales E1 y E2 por ser en las que principalmente se han encontrado estos cambios (**Green et al.**, 2005). Trabajos de Brault, para el caso de las cepas de tipo IE, sugieren fuertemente que cambios provocados por presión positiva específicamente en la glicoproteína E2 se asocian a la remergencia del virus, esto se estudió analizando cepas de México y Guatemala utilizando aislados del 1993, 1996 y 1968, 1970 respectivamente; las cuales estuvieron involucradas en epizootias que afectaron a equinos. Con estos datos podemos inferir que utilizando el gen E2 de VEEV, podemos realizar una comparación de aminoácidos la cual va a reflejar las características del brote con aislados anteriores, así como determinar si los cambios sugeridos anteriormente se mantiene o estos motivos están cambiando así como la realización de una adecuada reconstrucción filogenética. En el caso de México los estudios de filogenia y análisis epidemiológicos son escasos para el VEEV por lo cual se considera relevante la realización de este trabajo.

2.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las enfermedades reemergentes y zoonóticas como la EEV tienen severas afectaciones tanto económicas como para la salud, debido a esto se considera una enfermedad de declaración obligatoria para la Organización Internacional de Epizootias (OIE). En el caso de México, existen reportes de la circulación del VEEV, específicamente del subtipo IE el cual provocó una epizootia en 1996; por esta razón es necesario mantener una vigilancia permanente con respecto a la aparición de casos de encefalitis. Como se mencionó anteriormente el VEEV está conformado por las proteínas no estructurales (ns1- a ns-4) y estructurales (E1, E2 y E3), siendo E2 una de las más estudiadas (**Holmes** 2006,

Green et al., 2005; **Kinney et al.**, 1993; **Brault et al.**, 2001);, por lo cual se considera que realizando análisis filogenéticos utilizando el gen E2 de los aislados del 2011 de Veracruz y Tabasco y utilizando secuencias de brotes anteriores con respecto a los registrados recientemente en México, podemos obtener con detalle la relación espacio temporal de estos, de igual forma con este tipo de análisis podemos crear hipótesis más certeras sobre el origen del virus, a su vez los estudios moleculares y evolutivos nos permite tener bastantes datos acerca del comportamiento y evolución de este a fin de tener información más detallada que permitirá desarrollar estrategias más específicas de prevención y control para futuros brotes.

2.2. JUSTIFICACIÓN

El aumento de la población humana, sus desplazamientos así como asentamientos en nichos ecológicos nuevos, han provocado cambios en la dinámica ecológica de algunas zonas geográficas; proporcionado así las características ideales para la aparición de enfermedades virales, que son capaces de mermar poblaciones humanas como otras especies, provocando epidemias que pueden resultar severas tanto para los humanos como los animales. Los virus, se asocian a cuadros patológicos que muchas veces son severos para el hombre, afectando a las poblaciones en la mayoría de los casos. Es importante conocer el comportamiento de los virus así como su evolución, ya que hay condiciones que generan cambios que muchas veces resultan benéficos para éstos, ayudando a su rápida diseminación y cambiando así sus características de patogenicidad, y con esto la aparición de brotes en zonas donde no se encontraba anteriormente. Los análisis filogenéticos de virus, permite realizar una buena inferencia acerca de estos cambios evolutivos. En el caso del VEEV, que es zoonótico y que infecta principalmente a los equinos, y eventualmente humanos por lo que su diseminación puede provocar serios problemas de salud y económicos. En México este virus es considerado exótico siendo así importante su detección; desde 1996 la CPA, es la encargada de llevar a cabo las tareas de vigilancia sobre la aparición de este virus en equinos. Por lo anterior se considera importante realizar estudios filogenéticos y evolutivos de los casos aislados en equinos afectados por EEV en México en el 2011, ya que estos datos son importantes para realizar la caracterización molecular de dicho virus, brindando la información necesaria para prevenir futuros brotes.

2.3. HIPÓTESIS.

Si estudios previos en el VEEV, han demostrado que sus bajas tasas de diversidad genética se relaciona con el establecimiento de nichos ecológicos que se mantienen circulando en diferentes zonas geográficas de forma endémica, entonces la diversidad genética del virus está relacionada con los efectos de la selección negativa a nivel poblacional y por lo tanto, podemos inferir que cambios mínimos en el genoma del VEEV pudieran asociarse a eventos de reemergencias del subtipo IE que circula en México lo que podría explicar la presencia de casos aislados en el 2011 en Tabasco y Veracruz, descartando que se trate de una introducción de otra zona geográfica.

2.4. OBJETIVO GENERAL

Realizar el análisis filogenético de la secuencia de la glicoproteína E2 obtenida de los virus de la EEV (Encefalitis Equina Venezolana) aislados en el brote del 2011 en México.

2.4.1. OBJETIVOS PARTICULARES

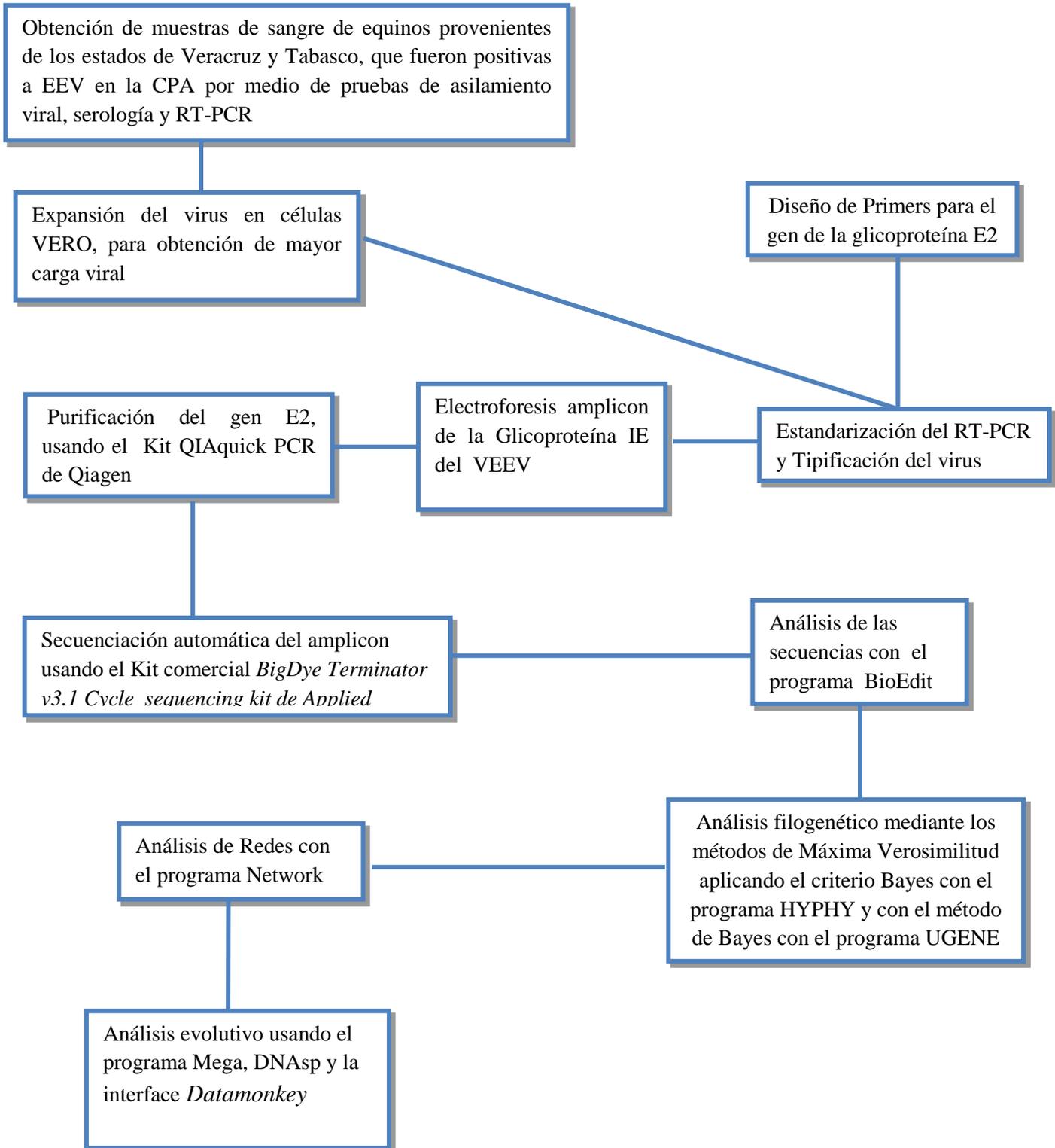
2.4.1.1. Diseño de “primers” específicos para la amplificación de la glicoproteína E2 (1351 pb) del Virus de Encefalitis Equina Venezolana del aislado del brote del 2011 en México. Asimismo se hará la estandarización de la RT-PCR para la obtención del amplificado.

2.4.1.2. Secuenciación automática del amplificado y edición de la secuencia.

2.4.1.3. Análisis filogenético por *máxima verosimilitud*, *inferencia bayesiana* y *máxima verosimilitud aplicando criterio de Bayes* utilizando los programas MEGA, Hyphy y UGENE a fin de establecer la relación espacio temporal, entre la cepa del VEEV aislado en el brote del 2011 en México, y otras cepas reportadas a previamente a nivel mundial.

2.4.1.4. Hacer análisis de redes con el programa Network así como análisis evolutivo y la caracterización molecular del virus utilizando los programas Mega, DNAsp y Data Monkey.

2.5. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



2.6. MATERIAL Y METODOS

2.6.1. Obtención de Muestras. Las muestras que se utilizaron para este trabajo corresponden a sangre de equinos provenientes de los estados de Veracruz y Tabasco que fueron sometidas a pruebas de diagnóstico, durante 2011 en la CPA (Comisión México-Estados Unidos para la prevención de la fiebre aftosa y otras enfermedades de tipo exótico en animales), mediante las técnicas de aislamiento viral en ratón lactante, cultivo celular y amplificación por RT-PCR. El virus utilizado para este trabajo es el proveniente de los cultivos infectados de células VERO (células de riñón de mono verde).

Expansión del virus en cultivo celular. Para el aislamiento viral se utilizaron cultivos de células VERO cultivadas en botellas 20 cm² con una confluencia de al menos el 70% a las cuales se les desecharon el sobrenadante y se enjuagaron con tripsina (0.05%) y finalmente la tripsina se retiró totalmente enjuagando la monocapa con 10ml de medio MEM, posteriormente se inoculó la monocapa con 500 µl de suero diluido previamente en medio MEM (1:5) y filtrado con filtros Millipore ® con un poro de 0.45 µm distribuyéndolo homogéneamente, y se dejó incubar durante 30 min a 37 °C. Transcurrido este tiempo se agregaron 4ml del MEM. Se observaron cada 24 horas, una vez visualizado el efecto citopático (ECP), las botellas fueron congeladas a -70 °C para sus posterior análisis (OIE, 2012).

2.6.2. Diseño de los iniciadores. Se realizó una búsqueda de secuencias del genoma del VEEV tanto del genoma completo como de fragmentos, en el Gen Bank <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=nucleotide&itool=toolbar>, para identificar la región codificante para la glicoproteína E2, se usó la secuencia con número de acceso AY823299.1. Los iniciadores se diseñaron de forma manual obteniendo 2 iniciadores que flanquean la región 8614 a 9825 que incluye al gen E2 y se diseñaron tres primers intermedios en la región (9224 y 9524) que se utilizaron para secuenciar al gen completo (Tabla II). Todos los primers se evaluaron utilizando la interface IDT <http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/Default.aspx> para que las secuencias candidato presentaran menor probabilidad de formar asas, homodímeros y heterodímeros, que pudieran afectar la reacción de amplificación y secuenciación (Figura 6).

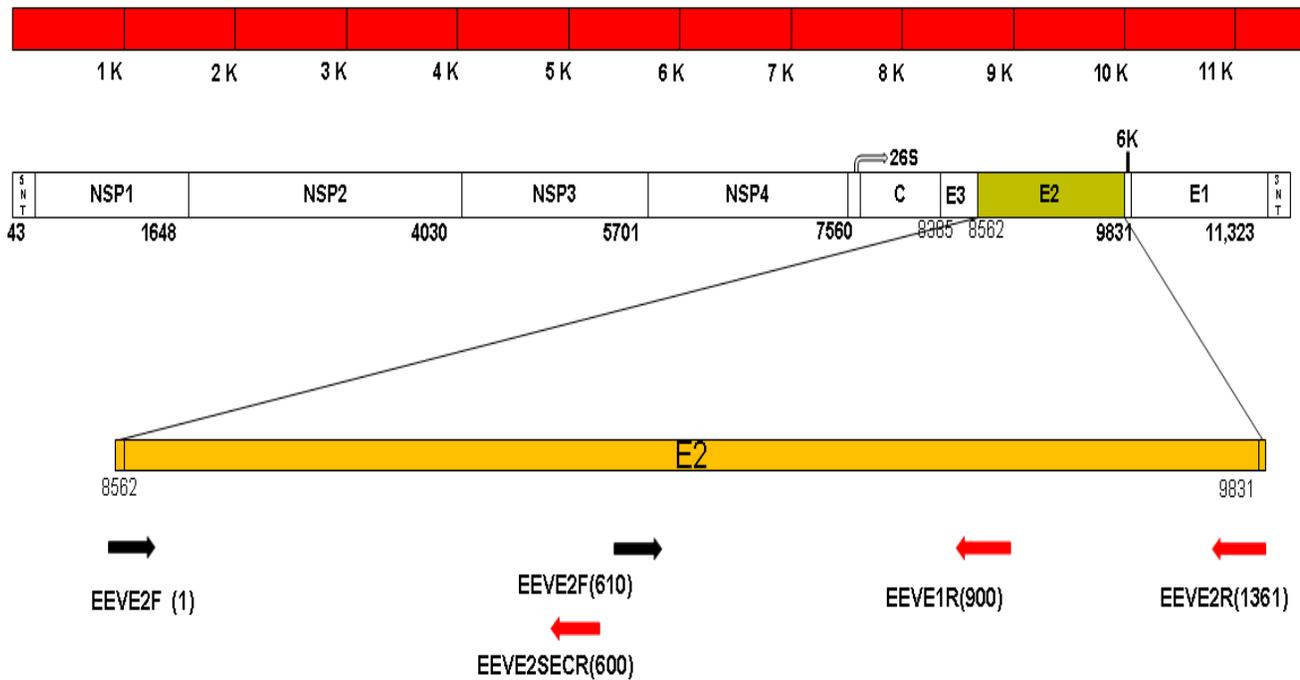


Figura 6. Diseño de oligonucleótidos para amplificación de la glicoproteína E2. Se muestra la región genómica que se amplifico en la presente investigación, se diseñaron cinco primers de los cuales dos fueron utilizados para el proceso de amplificación que son EEVE2F (1) y EEVE2R (1361), a su vez se diseñaron tres primers internos lo cuales fueron utilizados para el proceso de secuenciación.

TABLA II. Iniciadores diseñados para la amplificación y secuenciación de la glicoproteína E2.

Nombre	Secuencia en sentido 5' a 3'
EEVE2F1-22	5' caatcctgggttacgacgagttg 3'
EEVE1R900	5' ggttcttgggatgaagttcagag 3'
EEVE2F610	5' agttctgttcattgtgactcc 3'
EEVE2R1361	5' atctgctgattgtgttcc 3'
EEVE2SECR.600	5' ggagtcacatgaacagaact 3'

Se muestran los iniciadores que se utilizaron para la amplificación del gen E2 que corresponde a EEVE2F 1-22 y EEVE2R1361, el resto de los iniciadores fueron utilizados junto con los de la amplificación para secuenciar el producto de la RT-PCR.

2.6.3. Extracción del ARN. Para la extracción del ARN viral se utilizó la técnica de TRIZOL (Trizol® Reagent) para lo cual a 250 µl de aislado viral se le agregaron 750 µl de TRIZOL en un microtubo de 1.7 ml. Una vez completada la homogenización y tras un periodo de incubación de 15 minutos a temperatura ambiente (TA), se adicionaron 200 µl de cloroformo grado biología molecular (Sigma®) y se mezcló utilizando un vórtex. Después de 10 minutos de incubación a TA, las muestras se centrifugaron a 13,000 rpm durante 15 minutos, la fase acuosa fue colectada (400 µl aproximadamente) y puesta en un nuevo microtubo. Para precipitar el ARN se adicionaron 500 µl de isopropanol, y se incubó 10 minutos a temperatura ambiente, las muestras fueron nuevamente centrifugadas a 12,000xg durante 15 minutos. Finalmente el ARN precipitado se lavó utilizando 1 ml de etanol al 75 %. Las pastillas de ARN fueron suspendidas en 50 µl de agua tratada con dietilpirocarbonato (DEPC) y fueron utilizadas inmediatamente para hacer la reacción de RT-PCR.

2.6.4. Optimización de la RT-PCR para amplificar el gen E2. Para la estandarización de la RT-PCR se realizó un gradiente de temperatura de 50 °C a 60.1 °C con la finalidad de establecer la temperatura óptima para la alineación de los iniciadores. Las condiciones iniciales RT-PCR que se usaron fueron las establecidas para el diagnóstico VEEV el cual consiste en: un ciclo de 30 min a 48 °C para la retrotranscripción, seguido por 10 min a 95 °C para la activación de la Taq polimerasa. Para el PCR se realizaron 35 ciclos utilizando una temperatura de desnaturalización de 95 °C por 30 segundos, seguido por una temperatura de alineamiento de 50 °C por 45 segundos y una temperatura de extensión a 72 °C por 2 min finalmente una extensión a 72 °C por 5 min. Los productos de amplificación fueron visualizados en un gel de agarosa al 1.5 % teñido con bromuro de etidio. El protocolo para la mezcla de reacción fue el del Kit One- Step de Qiagen® según las recomendaciones del proveedor.

2.6.5. Purificación del producto de la amplificación. Posteriormente se purificó el producto del RT-PCR, para ello se usó el kit de purificación QIAquick PCR Purification de Qiagen®. Lo primero fue cuantificar la cantidad de templado resultado de la RT-PCR, posteriormente se agregaron 5 veces el volumen obtenido de la solución amortiguadora (PB), esto se mezcló en un tubo eppendorf cónico de plástico de 2.5 ml, la mezcla fue

transferida a una columna y se centrifugó durante 60 segundos a 13,000 rpm , se desechó el tubo colector y se adicionaron 750 µl de Buffer de lavado (PE) en la columna nuevamente se centrifugó por 60 segundos y se desechó el sobrenadante del tubo, el cual se volvió a colocar en la columna y se dio una última centrifugación por 1 minuto para deshidratar totalmente la columna, finalmente se adicionaron 50 µl de Buffer de elución (EB) colocando la gota en el centro de la membrana e incubando por 3 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó 13,000 rpm por 1 minuto.

2.6.6. Procedimiento de secuenciación. Se utilizó el kit de secuenciación *BigDye Terminator v3.1 Cycle sequencing kit de Applied biosystems*. La reacción se llevó a cabo en un termociclador de la marca *Termo Electron Corporation* , el protocolo incluye un paso de desnaturalización de 96 °C por 10 min seguido de un paso de alineamiento a 50 °C por 5 segundos y finalmente un ciclo de extensión de 60 °C por 4 min. La reacción de secuencia se realizó conforme a las indicaciones del proveedor. Una vez terminada la reacción de secuenciación, se adicionaron directamente a los tubos de PCR 2 µl de sulfato dodecil de sodio (SDS) en una solución al 2.2 % con agua desionizada, estos fueron colocados nuevamente en el termociclador en un programa que incluye un ciclo de 98 °C por 5 min seguido de uno de 25 °C por 10 min. Posteriormente los productos fueron pasados por una columna de sílice Centri-Sep (Princeton Separations CS-901), previamente hidratada por 2 horas, tras una centrifugación de 3000 rpm durante 3 minutos, el producto final fue secado a 80 °C durante 20-30 min y después reconstituido con formaldehído. Finalmente la secuencia se obtuvo usando un secuenciador automatizado, de la marca Applied Biosystems modelo 3730 A.

2.6.7. Análisis Filogenético. Una vez obtenidas las secuencias éstas fueron alineadas usando el método ClustalW (Thompson *et al.*, 1997) y editadas utilizando el programa BioEdit versión 7.0. Para realizar la reconstrucción filogenética primero se determinó el mejor modelo de sustitución nucleotídica empleando para ello el programa Mega versión 5.0 (Tamura *et al.*, 2011) de igual forma el modelo fue determinado con *Model test* para comparar el resultado (Posada D. and Crandall K.A., 1998) ésto utilizando la interface Data Monkey. La reconstrucción filogenética se realizó por tres métodos: método de distancias Máxima Verosimilitud usando MEGA, Máxima verosimilitud aplicando criterio Bayes con

el programa Hyphy y Bayes utilizando el programa UGENE (<http://ugene.unipro.ru/download.html>), el análisis de redes se elaboró con el programa Network. Para establecer la relación filogenética de los genotipos de este trabajo con otros previamente reportados, se hizo una búsqueda de secuencias del VEEV en el Genbank utilizando para la reconstrucción filogenéticas las secuencias de las Tablas III y IV.

2.6.8. Análisis de redes. La reconstrucción de las filogenias de datos intraespecíficos es una ardua tarea debido a que muchas veces se trata de muestras de gran tamaño con pequeñas distancias genéticas, obteniendo así arboles plausibles que se pueden expresar mejor por una red la cual muestra los posibles cambios evolutivos en forma de ciclo. Para el análisis se utilizaron los alineamientos previamente realizados para la reconstrucción filogenética, estos archivos en formato FASTA, se convirtieron a formato RDF utilizando el programa DNAsp (**Librado et al.**, 2009), estos datos se ingresaron al programa Network (**Bandel et al.**, 1995, **Bandel et al.**, 1999, **Foster et al.**, 2001, **Polzin and Daneschmand**, 2003) y se calcula el árbol, para enraizar se utilizó el método MJ (Median Joinin), utilizando Pesos: $\alpha = 10$, $\beta = 0$ (por MJ) o $r = 2$. Posteriormente se utilizó RM epsilon, MP Opción para purgar enlaces superfluos y vectores de red mediana. Posteriormente se dibujó, un árbol en forma de red se volvió a calcular epsilon cambiando a 10, 20, 30 (por MJ) y posteriormente este formato se visualizó como una red filogenética o árbol sin raíz en un formato FDI. Observando en el gráfico claramente, la diferencia entre las secuencias ya que indica el número de mutaciones entre éstas.

Tabla III. Secuencias utilizadas para el análisis filogenético del VEEV

	Nº. de acceso GenBank	PAÍS	CEPA	VARIEDAD	ORIGEN	PASAJE	AÑO
IAB	AF093103	PERÚ	52/73	IAB	Burro	SM2	1973
	AF093101	PERÚ	Ica	IAB	Equino	Sin dato	1946
	AF093105.1	VENEZUELA	E123/69	IAB	Humano	SM1, CEC1	1969
	AF093104	PERÚ	PIURA	IAB	Equino	P>200	1942
	AF093100	VENEZUELA	EI/68	IAB	Humano	SM1, CEC1	1968
	LO1443	TRINIDAD Y TOBAGO	EEVNSPENV	IAB(VACUNAT C83)	Burro	GP1, V6, BHK1	1943
	AF093102	VENEZUELA	541/73	IAB	Humano	SM1, CEC2	1973
	M14937	TRINIDAD Y TOBAGO	EEVTD26S	IAB	Sin dato	Sin dato	1996
	LO1442	VENEZUELA	EEVNSPEPA	IAB	Burro	GP1, V6	1943
	AY741139	USA	V3526	IAB	Sin dato	Sin dato	2004
	AF004466	COLOMBIA	CoAn5384	IAB	Equino	SM1, CEC2	1967
	AF004470	GUATEMALA	69Z1	AB	Humano	SM2	1969
	AF004471	VENEZUELA	Beck Wycoff	IAB	Equino	SM8, CEC1	1938
	AF069903	TEXAS	71-180	IAB	Equino	SM1, H1, V1, C6/36-1	1971
IC	U55347	VENEZUELA	6119	IC	Humano	BHK1	1995
	LO4653	VENEZUELA	Miranda	IC	<i>Aedes triannulatus</i>	SM-1, V-7	1963
	AY973944	VENEZUELA	254934	IC	Equino	Sin dato	1995
	U55346	VENEZUELA	Panaquire	IC	Mosquito	SM-2, V-2, BHK-2	1983
	9626526	VENEZUELA	P676	IC	<i>A. Triannulatus</i>	SM4, BHK1	1963
	AF375051	VENEZUELA	P676-gb	IC	<i>A. Triannulatus</i>	SM1,V1	1963
	U55341	COLOMBIA	V178	IC	Equino	Sin dato	1961
	U55350	VENEZUELA	3908	IC	Humano	C6/36-1	1995
	AY9086475	VENEZUELA	255010	IC	Equino	Sin dato	2000
	AF004459	VENEZUELA	243937	IC	Equino	V1	1992
	U55342	VENEZUELA	VEU55342	IC	Sin dato	Sin dato	1995
	U55345	VENEZUELA	PMCHo5	IC	Human	SM-1, V-1, BHK-1	1995
U55360	VENEZUELA	SH3	IC	Humano	V1	1993	
ID	AF004464	PERÚ	IQT1724	ID	Humano	V1	1995
	DQ390224	PERÚ	IQT8131	ID	Humano	BHK1	1998
	GU085856	COLOMBIA	CoAn9004	ID	Hamster	SM3, V1	1969
	AF004467	COLOMBIA	CoAn9004	ID	Hamster	SM4, V1	1969
	GU085855	BOLIVIA	FVB258	ID	Humano	V1	2007
	GU085857	PERÚ	FMD749	ID	Humano	V1	2006
	AF004853	VENEZUELA	SH5	ID	Humano	V1	1993
	AF004458	VENEZUELA	66637	ID	Hamster	SM1, V1	1981
	AF100566	VENEZUELA	ZPC738	ID	Hamster	BHK1	1997
	AF004472	VENEZUELA	66457	ID	Hamster	SM1, V1	1981
	U55362	COLOMBIA	83U434	ID	Hamster	CEC1, V1	1983
	AF004465	COLOMBIA	V209A	ID	Ratón	SM2, V2	2006
	AF004441	COLOMBIA	306425	ID	Hamster	V2	1972
	AY966910	PERÚ	IQT7460	ID	Hamster	V2	2006
	GU085855	BOLIVIA	FVB258	ID	Humano	V1	2007
	GU085853	BOLIVIA	FVB200	ID	Humano	V1	2006
	AF348335_	VENEZUELA	MAC10	ID	Hamster	RK1, BHK1	1993
	LO0930_	PANAMÁ	3880	ID	Humano	SM1, V8	1998
	GU085854	BOLIVIA	FVB204	ID	Humano	V1	2006
	AF004852	PERÚ	DEI5191	ID	Humano	V1	1994
	GU085858	PERÚ	FM D1070	ID	Humano	V1	2007

IE	KF562710	MÉXICO ¹	CPA-VER11	IE	Equino	V1	2011
	KF562711	MÉXICO ²	CPA-TAB11	IE	Equino	V1	2011
	GU085859	MÉXICO	MX08-56H	IE	Hamster	V1	2008
	GU085860	MÉXICO	63U16	IE	Hamster	SM1, C6/36-1	1997
	AF448536	MÉXICO	OAX142	IE	Equino	SM1, RK1, C6/36-1	1996
	AF448537	MÉXICO	CPA201	IE	Equino	SM1, RK1, BHK1	1993
	AF448536	MÉXICO	OAX131	IE	Equino	SM1, RK1, C6/36-1	1996
	U96408	MÉXICO	VEU96408	IE	Sin dato	Sin dato	1996
	U34999	GUATEMALA	68U201	IE	Hamster	SM3, V2, BHK1	1968
	AF448535	MÉXICO	CPA152	IE	Equino	SM1, RK1, C6/36-1	1996
	AF448539	MÉXICO	80U76	IE	Hamster	C6/36-1	1980
	L04599	PANAMÁ	EEVE321	IE	Sin dato	Sin dato	1962
	AF075252	PANAMÁ	Menall	IE	Humano	SM3, V1	1962
AY823299	MÉXICO	MX01-22	IE	Hamster	Sin dato	2001	
IF	AF075257	BRASIL	78V-3531	IF	Mosquito	DEC1, SM3, V1	1978
II	AF075251	FLORIDA	EveFe3-7c	II	<i>Cx. (Mel.) Spp.</i>	SM3, V2, BHK1	1968
	AF004469	FLORIDA	Fe5-47et	II	Mosquito	C6/36-1	1965(80)
IIIA	FJ792610	TRINIDAD Y TOBAGO	Tri673	IIIA	<i>Cx. (Mel.) portesi</i>	SM1, V1	2007
	AJ792612	TRINIDAD Y TOBAGO	Tri570	IIIA	<i>Cx. (Mel.) portesi</i>	SM1, V1	2007
	FJ792611	TRINIDAD Y TOBAGO	Tri587	IIIA	<i>Cx. (Mel.) portesi</i>	SM1, V1	2007
	FJ792614	TRINIDAD Y TOBAGO	Tri550	IIIA	<i>Cx. (Mel.) portesi</i>	SM1, V1	2007
	FJ792613	TRINIDAD Y TOBAGO	Tri551	IIIA	<i>Cx. (Mel.) portesi</i>	V1	2007
	AF075253	BRASIL	MucamboBeAn.8	IIIA	Mono	P8	1954
	U822699	VENEZUELA	VEU82699	IIIA	Roedor	Sin dato	1995
	FJ792623	BRASIL	Bra69.Span156000	IIIA	Roedor	?, V1	1969
	FJ792620	TRINIDAD Y TOBAGO	Tri63	IIIA	Roedor	?, V2	1963
	FJ792616	TRINIDAD Y TOBAGO	Tri69	IIIA	Ratón	SM10	1969
	FJ792615	TRINIDAD Y TOBAGO	Tri70	IIIA	Ratón	SM20	1970
	FJ792621	TRINIDAD Y TOBAGO	Tri61	IIIA	Roedor	?, V1	1961
	FJ792622	TRINIDAD Y TOBAGO	TRVL3	IIIA	Roedor	?, V1	1961
	FJ792624	BRASIL	Bra69	IIIA	<i>Cx. (Mel.) portesi</i>	SM1, V1	1969
	FJ792625	BRASIL	Bra69	IIIA	Mono	SM2, V1	1969
	FJ792619	TRINIDAD Y TOBAGO	Tri65	IIIA	Mosquito	?, V1	1965
	FJ792617	TRINIDAD Y TOBAGO	Tri71	IIIA	Ratón centinela	SM1	1971
IIIB	AF075254	GUYANA	Tonate	IIIB	Ave	SM3, V1	1973
IIIC	AF075255	PERÚ	7ID-1252	IIIC	Mosquito	SM1	1971
IV	AF075256	BRASIL	Pixuna	IV	<i>A. nimbus</i>	SM4	1961
V	AF075259	GUYANA	Cabassou	V	Mosquito	SM4, CEC1	1968
VI	AF075258	ARGENTINA	AG80-663	VI	Mosquito	P4, SM2	1980

1. Cepa aislada en este estudio correspondiente al estado de Veracruz

2. Cepa aislada en este estudio correspondiente al estado de Tabasco

Tabla IV. Secuencias utilizadas para el análisis filogenéticos del subtipo IE del VEEV

N _{o.} de acceso GenBank	PAIS	CEPA	VARIEDAD	ORIGEN	PASAJE	AÑO
KF562710	MÉXICO ¹	CPA-VER11	IE	Equino	v1	2011
KF562711	MÉXICO ²	CPA-TAB11	IE	Equino	v1	2011
GU085859	MÉXICO	MX08-56H	IE	Hamster	v1	2008
GU085860	MÉXICO	63U16	IE	Hamster	SM1, C6/63-1	1963
AF448536	MÉXICO	OAX142	IE	Equino	SM1, RK1, C6/36-1	1996
AF448537	MÉXICO	CPA201	IE	Equino	SM1, RK1, BHK1	1993
AF448536	MÉXICO	OAX131	IE	Equino	SM1, RK1, C6/36-1	1996
U96408	MÉXICO	VEU96408	IE	Sin dato	Sin dato	1996
U34999	VENEZUELA	VEU34999	IE	Sin dato	Sin dato	1968
AF448535	MÉXICO	CPA152	IE	Equino	SM1, RK1, C6/36-1	1996
AF448539	MÉXICO	80U76	IE	Sin dato	Sin dato	1980
L04599	PANAMÁ	EEVE321	IE	Sin dato	Sin dato	1962
AF075252	PANAMÁ	Menall	IE	Humano	sm3, v1	1962
AY823299	MÉXICO	MX01-22	IE	Hamster	BHK1	2001
AF004450	PANAMÁ	BTR139707	IE	Sin dato	Sin dato	1965
AF055840.1	GUATEMALA	672U17	IE	Sin dato	Sin dato	1967
AF055836.1	HONDURAS	67U208	IE	Sin dato	Sin dato	1967
AF055837.1	NICARAGUA	2177B	IE	Sin dato	Sin dato	1998
AF055839	BELICE	67U201	IE	Sin dato	Sin dato	1967
AF055838	MÉXICO	63R20	IE	Sin dato	Sin dato	1963
U96405	MÉXICO	ISET-TAB91	IE	Sin dato	Sin dato	1991
AF055834	GUATEMALA	77U214	IE	Sin dato	Sin dato	1977
AF055845	GUATEMALA	80U76	IE	Sin dato	Sin dato	1998
AF448539A	MÉXICO	80U76	IE	Hamster	C6/36-1	1980
AF055841	GUATEMALA	71U338	IE	Sin dato	Sin dato	1971
AF055842	GUATEMALA	71U384	IE	Sin dato	Sin dato	1971
AF055844	GUATEMALA	73U157	IE	Sin dato	Sin dato	1998
U96404	MÉXICO	ISET-CHI93	IE	Sin dato	Sin dato	1993
JQ859943	MÉXICO	H50	IE	Hamster	v1	2008
GU085859	MÉXICO	MX08-56H	IE	Hamster	v1	2008
JQ859951	MÉXICO	H91	IE	Hamster	v1	2010
JQ859949	MÉXICO	H58	IE	Hamster	v1	2008
JQ859947	MÉXICO	H54	IE	Hamster	v1	2008
JQ859946	MÉXICO	H53	IE	Hamster	v1	2008
JQ859948	MÉXICO	H55	IE	Hamster	v1	2008
JQ859944	MÉXICO	H51	IE	Hamster	v1	2008
JQ859952	MÉXICO	H94	IE	Hamster	v1	2010
JQ859953	MÉXICO	H95	IE	Hamster	v1	2010
JQ859945	MÉXICO	H52	IE	Hamster	v1	2008
JQ859955	MÉXICO	H52	IE	Hamster	v1	2008
JQ859958	MÉXICO	M64	IE	<i>Cx. Taeniopus</i>	v1	2009
JQ859957	MÉXICO	M51	IE	<i>Cx. Nigripalpus</i>	v1	2009
JQ859956	MÉXICO	M50	IE	<i>M. Titillans</i>	v1	2009
JQ859955	MÉXICO	M49	IE	<i>Cq. Nigricans</i>	v1	2009
JQ859950	MÉXICO	H60	IE	<i>Hamster</i>	v1	2009
JQ859954	MÉXICO	M48	IE	<i>Cx. Nigripalpus</i>	v1	2009
AF348336	VENEZUELA	MAC87	ID	Sin dato	Sin dato	1993
AF348335	VENEZUELA	MAC10	ID	Hamster	RK1, BHK1	1993
AF093104	PERÚ	Piura	IAB	Equino	p>200	1942
AF093100	VENEZUELA	E1/68	IAB	Humano	SM1, CEC1	1968
AF093105.1	VENEZUELA	E123/69	IAB	Humano	SM1, CEC1	1969
AF093102	VENEZUELA	E541/73	IAB	Humano	SM1, CEC2	1973
M14937	TRIINDAD Y TOBAGO	EEVTD26S	IAB	Sin dato	Sin dato	1973

1. Cepa aislada en este estudio correspondiente al estado de Veracruz

2. Cepa aislada en este estudio correspondiente al estado de Tabasco

2.6.9. Análisis Evolutivo. Este se llevó a cabo realizando la comparación de las secuencias de aminoácidos a partir de los alineamientos; utilizando el programa MEGA se realizó la prueba de Tajima para descartar la selección de tipo neutral, posteriormente se evaluó la proporción relativa de sustituciones sinónimas y no sinónimas para inferir el tipo de selección que está actuando sobre el virus (Nielsen R, and Yang, Z 1998). La relación (también referida como dN/dS) se interpretó como evolución neutral, selección positiva y selección negativa, utilizando la interface Data Monkey. Adicionalmente se realizó la comparación de secuencias de nucleótidos utilizando el programa UGENE para determinar la similitud de las secuencias del subtipo IE, obteniendo una matriz de similitud.

2.7. Determinación de la presión Selectiva. Todos los métodos a continuación descritos se llevaron a cabo utilizando el programa DNAsp y la interface *Datamonkey*. El método SLAC (*Single Likelihood Ancestro Counting*) (Kosakovsky Pond S. L. and W. Frost S. D., 2005), que estima la proporción de dN/dS para cada codón en el alineamiento. Se describe brevemente a continuación: Se seleccionó un modelo de sustitución nucleotídica, de acuerdo a los datos, se construyó un árbol filogenético por el método de *Neighbor-Joining* usando el método de máxima verosimilitud para obtener el valor de bootstrap de las ramas y los rangos de sustitución, a partir del cálculo de los parámetros anteriores se obtuvo una proporción global dN/dS, utilizando los parámetros anteriores, se reconstruyeron las secuencias de los codones ancestrales sitio por sitio utilizando el método de máxima verosimilitud, posteriormente por cada sitio variable cuatro rangos con sustituciones sinónimas y no sinónimas fueron calculados, normalizadas y esperadas (ES y EN) y números observados (NS y NN). SLAC estimo $dN=NN/EN$ y $dS=NS/ES$. Si $dN < O > dS$ un codón es seleccionado como positivo o negativo. Se utiliza el valor de $p=0.10$ para dar significancia estadística.

3. RESULTADOS

3.1.1. Expansión del Virus en Células VERO

Los cultivos celulares son muy útiles en la identificación y replicación de los virus, ya que la presencia de estos implica cambios en la morfología de la célula, presentando un marcado efecto citopático (ECP), esto es una serie de cambios bioquímicos, moleculares y morfológicos, que el virus induce en la célula cuando éste la infecta; el VEEV es un virus que se replica en el citoplasma de la célula y principalmente se observan cambios como; redondeamiento de la célula, desprendimiento de la monocapa, proliferación de membrana nuclear, y finalmente formación de placas líticas en la monocapa, indicativo de la liberación de los viriones maduros.

Como resultado de la expansión de las muestras originales en cultivo celular observamos que después de 12 horas la monocapa ya mostraba ECP producto de la replicación del virus. En la imagen A, se muestra una monocapa en estado normal considerando también que se logran diferenciar algunas células muertas las cuales no corresponden propiamente a un ECP, en la imagen B se observa el control del ensayo para descartar algún tipo de contaminación, y finalmente en la imagen C se presenta el efecto citopático. Una vez observado el ECP las botellas que contenían el cultivo se cosecharon y congelaron a -4°C para después ser procesadas.

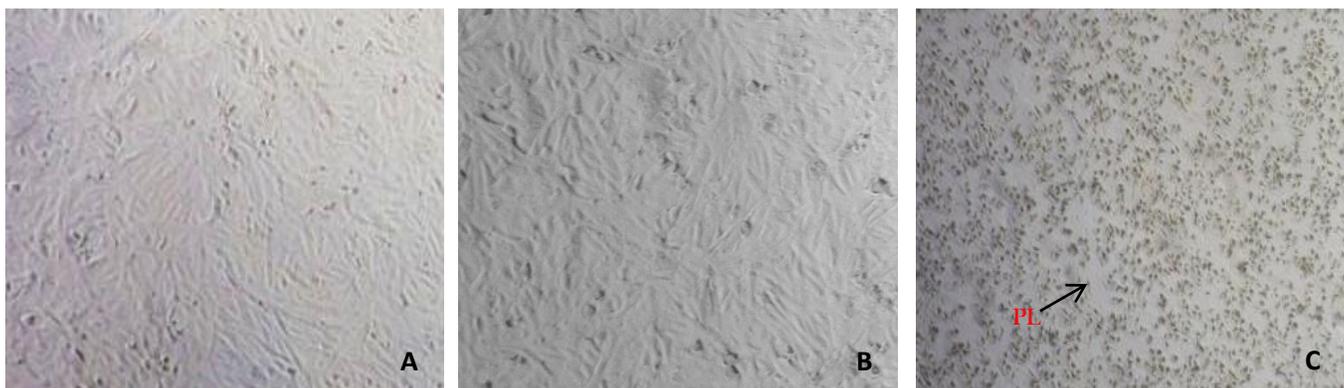


Figura 7. Expansión del virus en cultivo celular. Se aprecia el resultado de la expansión de las muestra en cultivo celular (VERO) en donde distinguimos A) Testigo, B) Control células VERO sin infectar y C) Monoestrato mostrando el efecto citopático por VEEV (PL, Placa lítica).

3.1.2. Estandarización de los métodos de RT-PCR

Antes de amplificar el gen de la glicoproteína E2 del VEEV se comprobó si las condiciones determinadas tanto para el programa como la reacción eran las adecuadas, para ello utilizamos el Kit ONE-STEP de Qiagen, así como los iniciadores diseñados y sintetizados en la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular (UNAM). Como templado se utilizó el control positivo de EEV el cual es utilizado para diagnóstico y de igual forma es producido en la CPA. Para la estandarización se realizó un gradiente de temperaturas para definir la T_M (temperatura de alineamiento) de los iniciadores. De igual forma se evaluó un programa de amplificación previamente establecido en el laboratorio de la CPA (apartado 2.6.5). Como se mencionó, la primera prueba se realizó con las siguientes condiciones: un ciclo de 30 min a 48 °C para la retrotranscripción seguido por 10 min a 95 °C para la activación de la Taq polimerasa. Para el PCR se realizaron 35 ciclos utilizando una temperatura de desnaturalización de 95 °C por 30 segundos, seguido por una temperatura de alineamiento de 50 °C por 45 segundos y una temperatura de extensión de a 72 °C por 2 min, finalmente una extensión a 72 °C por 5 min, en la cual se observa la amplificación de un producto de menor tamaño al esperado (resultado no mostrado).

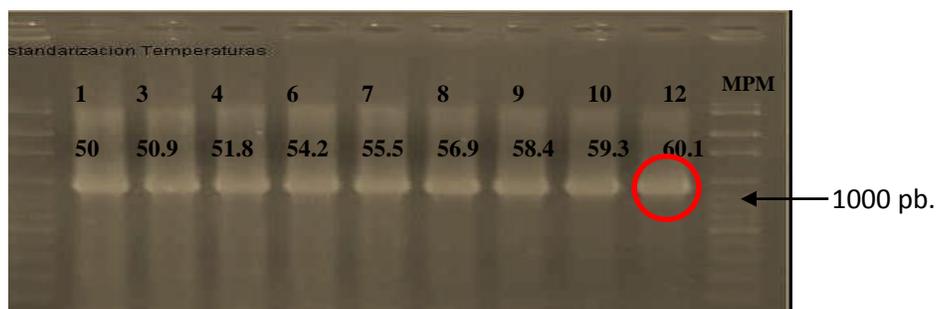


Figura 8. Gradientes para definir la temperatura de alineamiento de la RT-PCR. Se observa la electroforesis en donde se realizó un gradiente de temperatura que abarco de 50 °C a 60.1 °C esto para determinar cuál era la mejor temperatura de alineamiento a utilizar en la amplificación del gen E2.

En la figura 8 se observa la electroforesis de los amplificados obtenidos del gradiente de temperatura que se hizo para seleccionar temperatura óptima para la obtención de nuestro amplificado. La T_M que se consideró adecuada es el tubo 12 que corresponde a una

temperatura de 60.1 °C, por lo cual temperatura tomada para el programa de RT-PCR fue de 60 °C con lo que se logró el amplificado deseado.

3.1.3. Amplificación del gen E2 de aislados del VEEV

Las condiciones ya establecidas se emplearon directamente con las muestras originales, a fin de preservar el genotipo, sin embargo no se obtuvo ningún resultado positivo, excepto el control positivo. Esto podría deberse a una baja carga viral en la muestra, por lo que decidimos replicar el virus en cultivo de células VERO tal y como se mostró arriba en la figura 7.

Para la amplificación del gen E2 se utilizaron los primers EEVE2F1 y EEVE2R1361 y el ARN proveniente de las muestras de los estados de Veracruz y Tabasco, en la electroforesis se observan las bandas de los amplificados, que corresponde a un producto de 1,361 pares de bases, lo cual era lo esperado y coincide con nuestro control positivo, los resultados se muestran en la figura 9 (A) a su vez observamos en la figura 9 (B) el resultado de la purificación posterior del amplicon para la secuenciación.

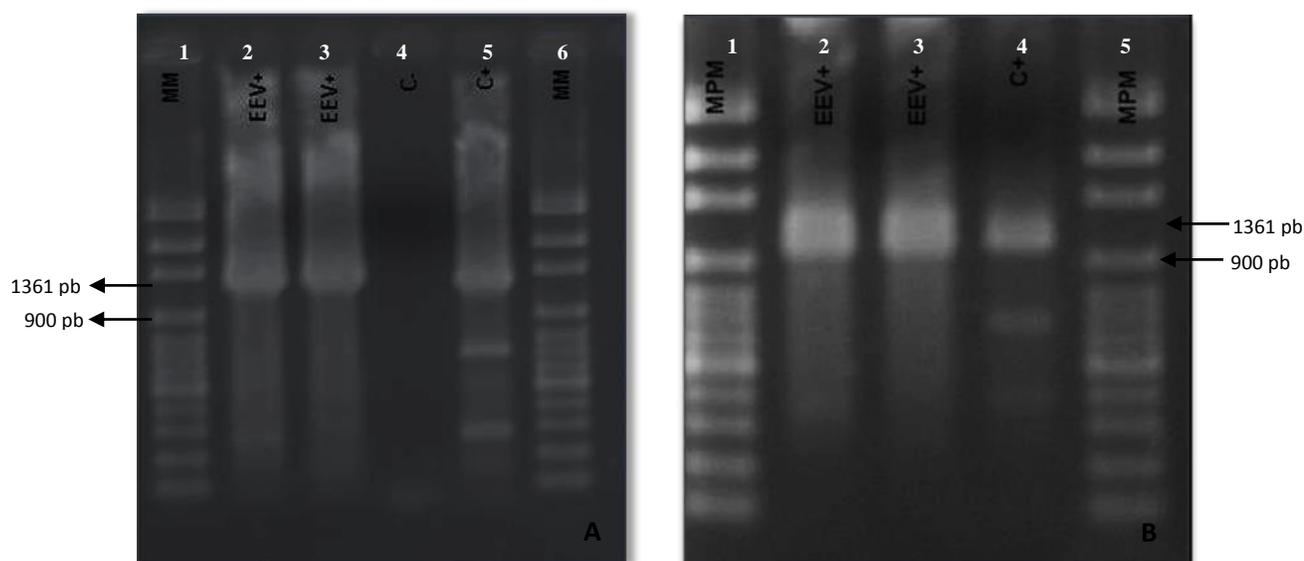


Figura 9. Amplificación de la glicoproteína E2 del Virus Encefalitis Equina Venezolana de aislados de equinos del 2011 de Veracruz y Tabasco. En el panel A se muestra en el carril 1 el marcador de peso molecular, carril 2 la muestra de Veracruz, carril 3 la muestra de Tabasco, carril 4 control negativo y en el carril 5 control positivo, en el panel B tenemos las muestras ya purificadas en donde el carril 1 corresponde al marcador de peso molecular, 2, la muestra de Veracruz, 3 la muestra de Tabasco y 4 el control positivo.

3.1.4. Secuenciación automática del gen E2 del VEEV

Para la secuenciación automática se utilizaron los primers EEVE2F1-22, EEVE1R900, EEVE2F610, EEVE2R1361, EEVE2SECR600 previamente diseñados, del total de esto cinco EEVE2F1-22 y EEVE2R1361 sirvieron para la amplificación del gen E2, mientras que para el proceso de secuenciación se utilizaron los cinco primers diseñados de los cuales tres se traslapaban ya que la capacidad del arreglo del secuenciador era de 800 pares de bases lo cual no permitía la secuenciación del fragmento completo en un solo proceso, se realizó el procedimiento para las dos muestras trabajadas en este estudio. Como resultado se obtuvieron cinco fragmentos algunos incluso de 900 pares de bases, esto para cada una de las reacciones por cada una de las muestras.

Para tener la secuencia completa del gen E2, los fragmentos que se obtuvieron de la secuenciación fueron alineados con el programa BioEdit, este procedimiento se realizó de manera individual por cada una de las muestras, una vez alineados se procedió a ensamblar la secuencia obteniendo un fragmento de 1361 pares de bases, el cual abarcaba una parte final de la glicoproteína E1 y la parte inicial de la proteína 6K, para obtener únicamente la secuencia del gen E2 se cortó el fragmento en marco de lectura obteniendo así finalmente un fragmento de 1269 nucleótidos y trasladado a aminoácido tenemos 443. Ambas secuencias se registraron en el GenBank con los números de acceso **KF562710** y **KF562711**.

Finalmente estas secuencias fueron introducidas en la interface del NCBI para realizar un BLAST con la finalidad de obtener una base de datos adecuada para la elaboración de las filogenias, se obtuvieron un total de 107 secuencias de las cuales no todas cumplían con las características para su utilización, el principal criterio de exclusión tenía que ver con el hecho de que las secuencias fueran específicamente de la región genómica del presente estudio, fueran del tamaño requerido para el estudio así como que no hubiera presencia de nucleótido indefinidos.

3.2. Análisis Filogenético

Se analizaron en total 86 secuencias específicamente en de la región del Gen E2 del Virus de Encefalitis Equina Venezolana, las cuales la mayoría consistieron en secuencias reportadas en el Gen Bank, dentro de estas se encuentran los dos aislados que se reportaron como positivos en la CPA a EEV, los cuales proviene de Tabasco y Veracruz de este trabajo.

El alineamiento constó de 1269 bases nucleotídicas, las cuales contenían 420 codones, 557 regiones conservadas y 706 regiones variables. La composición final del alineamiento de bases nucleotídicas fue Adenina (26.25%), Timina (22.39%), Citocina (26.70%), y Guanina (24.65%), al analizar la proporción de transiciones/transversiones se obtuvo una R=3.37, el modelo a utilizar en la reconstrucción fue TN93+G+I (Tamura Nei93 con distribución gamma y sitios invariantes), el cual toma en cuenta diferentes proporciones de transiciones y tranversiones, la composición de guaninas-citocina y al ser gama distribuido toma en cuenta diferencias en la sustitución de bases nucleotídicas.

Los análisis filogenéticos se realizaron por diferentes métodos esto es incluyendo métodos de distancia N-J (Neighbor Joining), UPGMA, Máxima Parsimonia y Máxima Verosimilitud esto con el programa MEGA. Por otro lado también se utilizó Bayes y Hyphy que utilizan criterios de reconstrucción distintos a los mencionados anteriormente, sin embargo las topologías no variaban mucho y de estos se tomó el que mostraba valores de ramas más altos.

A su vez se realizaron reconstrucciones filogenéticas utilizando secuencias con características diferentes, esto debido a que algunas de las secuencias específicamente del subtipo IE no se podían utilizar para realizar una análisis del gen completo ya que estas solo tenían 703 pb de la región a analizar y con la finalidad de incluirlas en este estudio se decidió realizar un análisis extra.

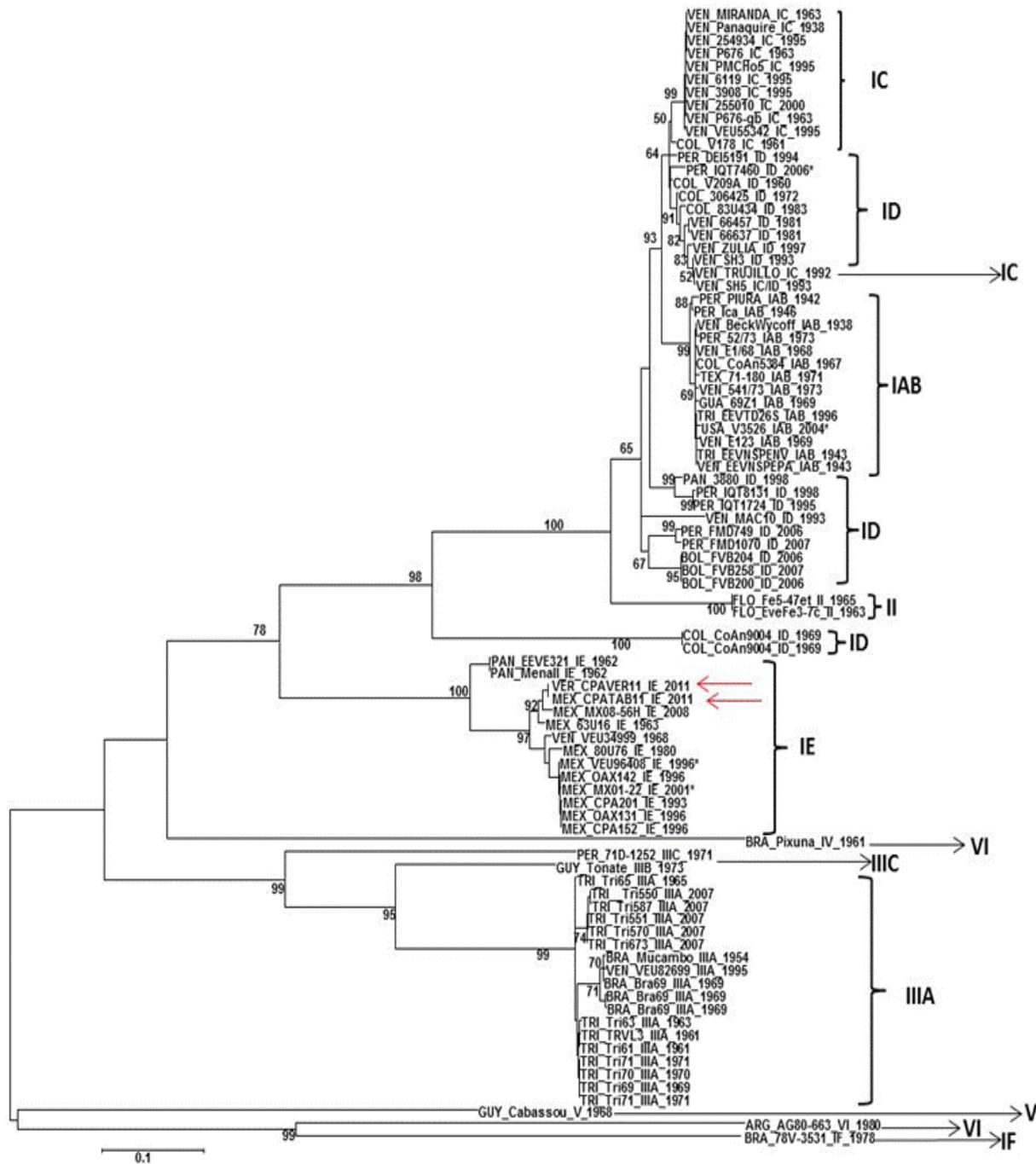


Figura 10. Árbol Filogenético por Máxima Verosimilitud usando el Gen E2 del VEEV. La reconstrucción fue inferida por el método de máxima verosimilitud basado en el modelo Tamura-Nei, Árbol inicial (s) para la búsqueda heurística se obtiene automáticamente de la siguiente manera. Cuando el número de sitios comunes era <100 o menos de la cuarta parte del número total de sitios de una parte, el método de máxima parsimonia se utilizó, de lo contrario se utilizó el método BIONJ con MCL. Una discreta distribución gamma se utiliza para modelar las diferencias evolutivas entre los tipos de sitios (5 categorías (+ G, parámetro = 0.6056)). El árbol está dibujado a escala, con longitudes de rama medidas en el número de sustituciones por sitio. El análisis incluyó a 86 secuencias de nucleótidos. Posiciones de codón incluidos fueron primero 2^a a 3^a. Todas las posiciones que contienen lagunas y los datos faltantes fueron eliminadas. Hubo un total de 1212 posiciones en el conjunto final de datos, que representan la glicoproteína E2 de VEE conjunto. Análisis evolutivo se llevaron a cabo en MEGA5. Las flechas señalan la ubicación de las secuencias del 2011 de Tabasco y Veracruz trabajadas en este estudio.

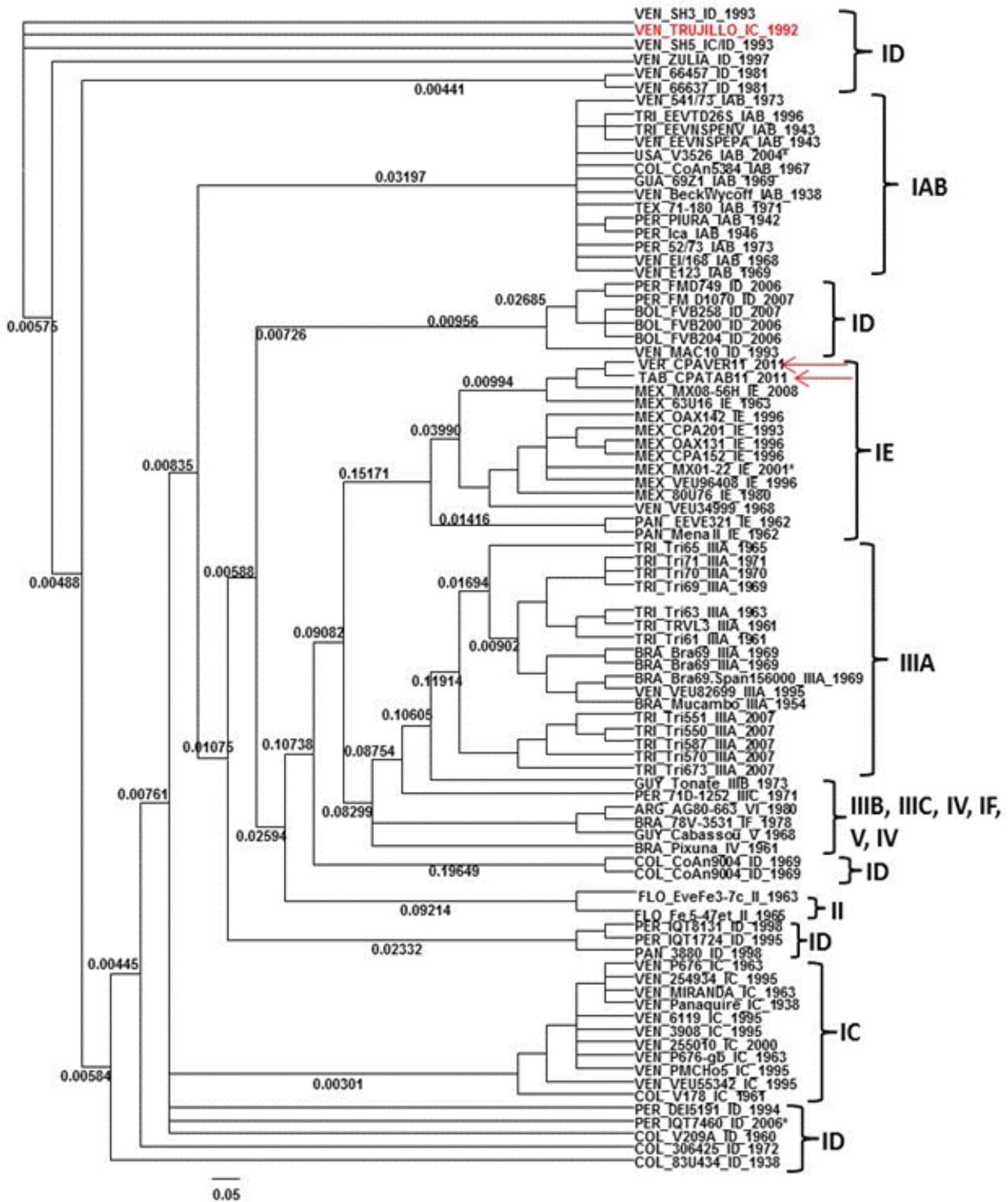


Figura 11. Árbol Filogenético por método de Bayes usando el Gen E2 del VEEV. Se muestra la reconstrucción filogenética realizada por el método de Bayes se empleó el modelo de sustitución nucleotídica de JC.69 (Nst=1), aplicando distribución Gamma discreta (G= 4+Sitios Invariables) con un bootstrap de 1,00000, utilizando 86 secuencias de una longitud de 1269 nucleótidos que corresponden a la glicoproteína E2 del VEEV, la secuencia se encuentra en marco de lectura. En el Genoma completo se localiza entre los nucleótidos 8504 a 9832 en un sentido 5' a 3', el análisis se realizó con el programa UGENE

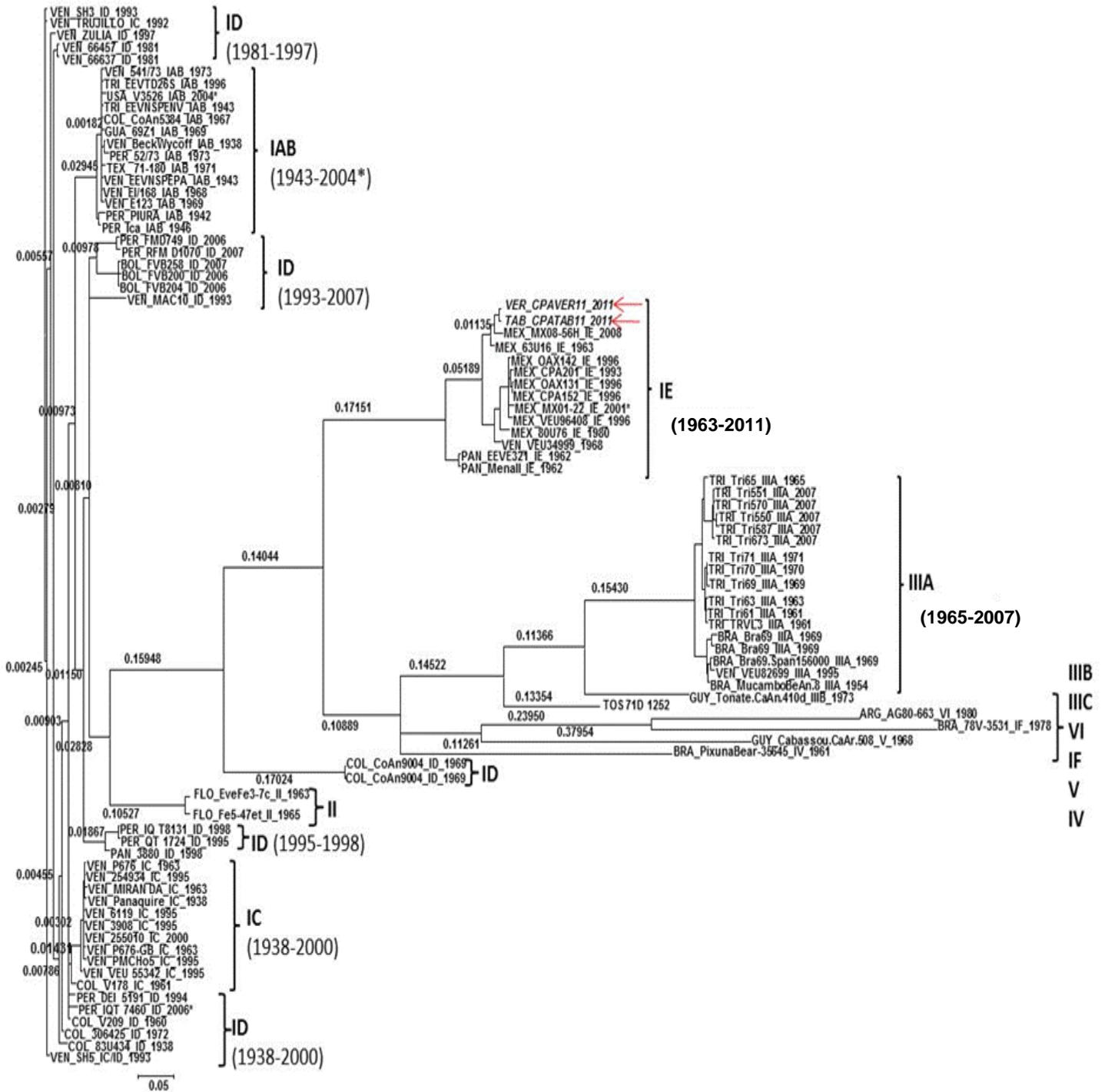


Figura 12. Árbol Filogenético utilizando Hyphy usando el Gen E2 del Virus de Encefalitis Equina Venezolana. Reconstrucción filogenética realizada por el método Máxima Verosimilitud aplicando el criterio de Bayes con un bootstrap de 2000 replicaciones, utilizando el modelo de Tamura-Nei con distribución Gama más sitios invariables (5 categorías(G+I)). La inferencia topológica se realizó con el método heurístico ML/Nearest-Neighbor-Inter change (NNI), utilizando para ello 86 secuencias con una longitud de 1269 nt (nucleótidos) que corresponde a la glicoproteína E2 del VEEV lo anterior se realizó con el programa HYPHY (S.L. Kosakovsky Pond, S.D. W. Frost an S.V. Muse. (2005) HyPhy: hypothesis testing using phylogenies. Bioinformatics 21: 676-679).

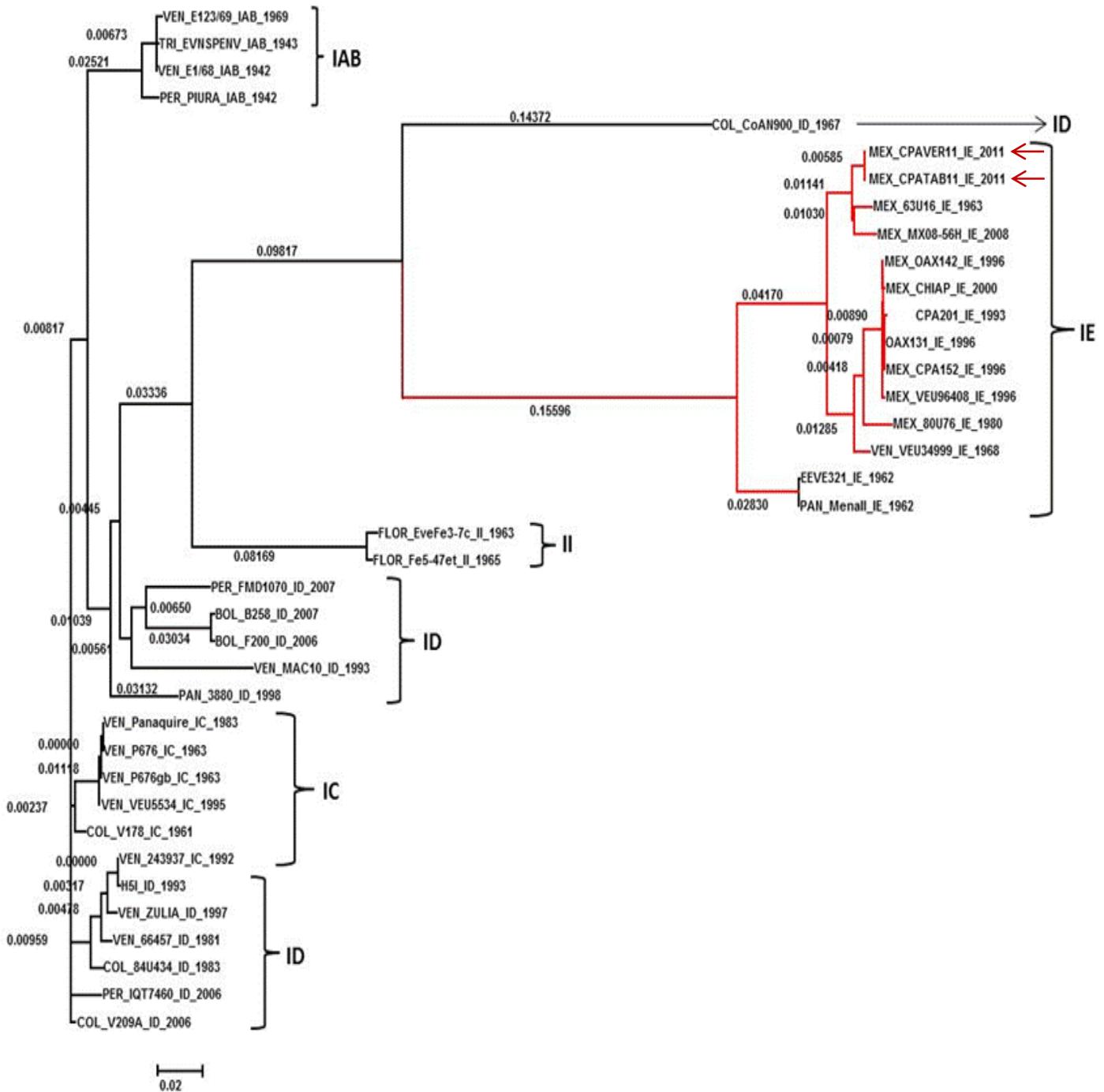


Figura 13. Árbol Filogenético elaborado con Hyphy usando el Gen E2 del Virus de Encefalitis Equina Venezolana. Reconstrucción filogenética realizada por el método Máxima Verosimilitud aplicando el criterio de Bayes con un bootstrap de 1,00000, utilizando el modelo de Tamura-Nei con distribución Gama más sitios invariables (5 categorías(G+I)). La inferencia topológica se realizó con el método heurístico ML/Nearest-Neighbor-Inter change (NNI), utilizando para ello 52 secuencias con una longitud de 1269 nt (nucleótidos) que corresponde a la glicoproteína E2 del VEEV lo anterior se realizó con el programa HYPHY (S.L. Kosakovsky Pond, S.D. W. Frost an S.V. Muse. (2005) HyPhy: hypothesis testing using phylogenies. *Bioinformatics* 21: 676-679).

3.2.1. Análisis filogenético de las cepas comparado con otros subtipos que circulan en América.

En la reconstrucción filogenética podemos distinguir dos grupos, el que engloba a los subtipos IAB, IC e ID, en el análisis realizado con diferentes métodos y analizando todos los arboles obtenemos topologías muy similares en cuanto al agrupamiento de estos subtipos, se muestra la estrecha relación de las cepas enzooticas ID y las cepas epizootica IC, sin embargo las cepas ID son separadas a su vez en dos grandes grupos dejando ver la diferencia entre genotipos dependiendo de la región geográfica donde estos circulan.

Sin embargo la distribución del subtipo ID no es homogénea en la reconstrucción filogenética ya que se encuentra en distintos clados agrupándose tanto con las cepas enzooticas como epizooticas en donde el grado de agrupamiento es mayor para el caso de las cepas epizooticas. El primer grupo con un valor de soporte de 64 % en el árbol de máxima verosimilitud, posteriormente en este se observa un tercer grupo el que corresponde a las cepas IAB el cual describe la epizootia del 1969 a 1971, posteriormente encontramos aislados ID pero en este caso corresponden a Perú, Bolivia y Florida, sin embargo el valor de soporte de la rama es menor de 50% lo cual se debe a la cepa AF348335 la cual es del año de 1993 en comparación de la mayoría de los aislados que corresponden a los años de 2006 y 2007, en este mismo grupo están a las cepas del subtipo II con un valor de soporte del 100%.

En este análisis la secuencia AF004853 que previamente en otros trabajos se reporta como IC/ID (Tabla III) se agrupa en el clado de cepas ID. Sucede lo mismo para el análisis de HYPHY, el subtipo ID se dividen en dos grupos uno más cercano a las cepas epizooticas IC con un valor de similitud de 0.00531 y otro que se relaciona más con las cepas enzooticas el valor del nodo es de 0.0081, (considerando que en este análisis el porcentaje de similitud se mide en decimales en donde el valor más cercano a cero corresponde a un 100 por ciento de similitud).

La cepa CoAn9004 que corresponde al subtipo ID se relaciona muy estrechamente con el subtipo II, manteniéndose dentro de los subtipos enzoóticos, este tipo de agrupamiento sugiere la posibilidad de que muy probablemente los orígenes de las cepas epizooticas provengan de variantes del subtipo ID enzoótico.

En el caso de los subtipos IE, IF, II, IIIA, IIIB, IIIC, IV, V y VI que son cepas enzoóticas utilizando el árbol elaborado con Hyphy, se observó que éstos subtipos parten de un nodo en común con un valor de similitud de 0.14044, el cual se divide en dos ramas la primera con un valor de soporte de 0.17151 que agrupa al subtipo IE con los tres linajes previamente descritos en la literatura, la otra rama del árbol con un valor de soporte de 0.10859 se encuentra el subtipo IIIA que muestra características similares al subtipo IE ya en ambos subtipos se ven periodos de estasis evolutivo que oscilan en aproximadamente 40 años para ambos subtipos, finalizando en eventos de reemergencia del virus; sin embargo de esta misma rama se derivan los subtipos IF, IIIB, IIIC, IV, V, y VI, por lo tanto lo podemos considerar como un grupo ideal, monofilético ya que presentan el mismo ancestro en común aunque las características antigénicas sean tan grandes que actualmente se consideran especies distintas.

A su vez se observó que los subtipos IIIB y IIIC son derivados del subtipo IIIA con un valor de bootstrap de 0.14522, por lo cual se infiere que son variedades del subtipo IIIA que tuvieron éxito, ya que no se han logrado aislar de nuevo, lo mismo ocurre con los subtipos V, VI y IF que se agrupan en este clado el valor de soporte es de 0.10889.

El análisis anterior confirmó la teoría que sugiere que el posible origen de la cepas epizooticas IC fue a partir de variantes enzoóticas ID por la estrecha relación evolutiva y encontrarlo dentro del grupo de este subtipo. De igual forma se sugiere que los subtipos V, VI, y IF fueron originados a partir del mismo ancestro en común de las variantes enzoóticas. La reconstrucción se realizó utilizando 87 secuencias, y posteriormente se tomaron las secuencias representativas para disminuir el número de secuencias, por último a fin de mejorar la topología se excluyeron los subtipos II.IIA, IIIB, IIIC, IV, V, VI esto para aumentar el valor y definir grupos entre las secuencias por la ambigüedad que se presentaba sobretodo en la secuencias ID (Figura 11).

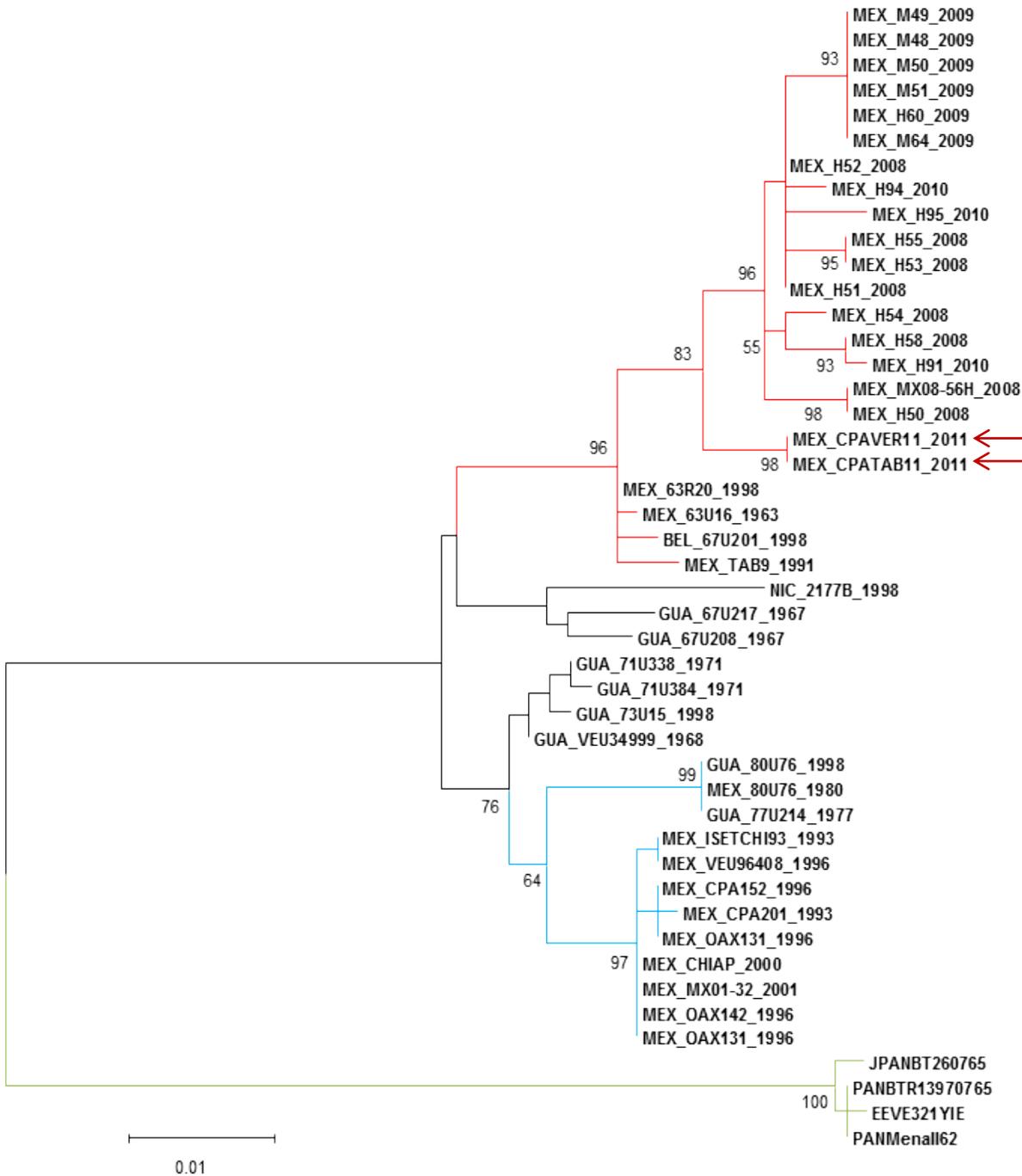


Figura 14. Árbol Filogenético elaborado con Hyphy para el subtipo IE usando el Gen E2 del Virus de Encefalitis Equina Venezolana. Reconstrucción filogenética realizada por el método Máxima Verosimilitud aplicando el criterio de Bayes con un bootstrap de 2000 replicaciones, utilizando el modelo de Tamura-Nei con distribución Gama más sitios invariables (5 categorías(G+I)). La inferencia topológica se realizó con el método heurístico ML/Nearest-Neighbor-Inter change (NNI), utilizando para ello 52 secuencias con una longitud de 703 nt (nucleótidos) que corresponde a la glicoproteína E2 del VEEV lo anterior se realizó con el programa HYPHY (S.L. Kosakovsky Pond, S.D. W. Frost an S.V. Muse. (2005) HyPhy: hypothesis testing using phylogenies. Bioinformatics 21: 676-679).

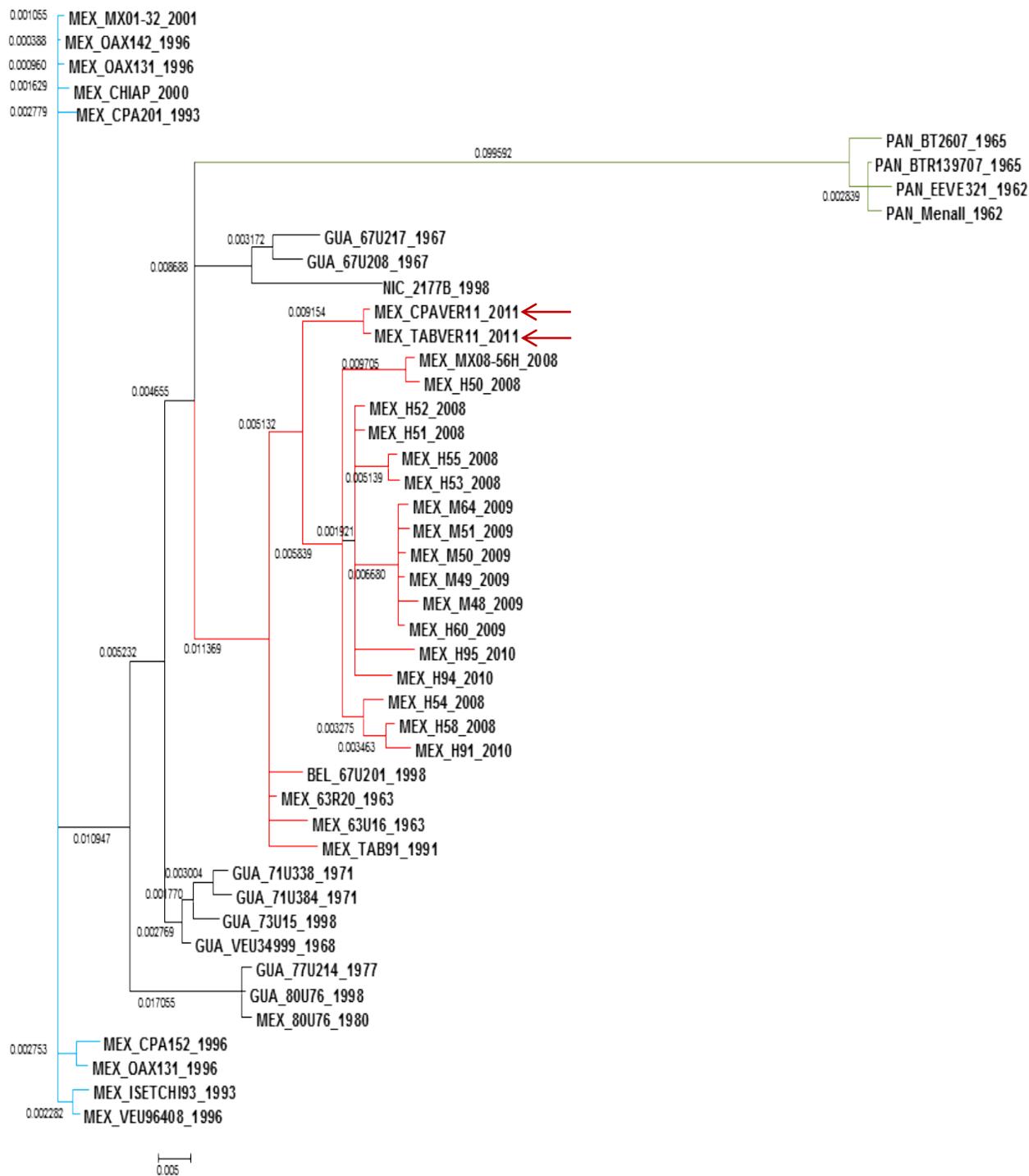


Figura 15. Árbol Filogenético elaborado con Hyphy para el subtipo IE usando el Gen E2 del Virus de Encefalitis Equina Venezolana. Reconstrucción filogenética realizada por el método de Bayes empleando el modelo de sustitución nucleotídica de JC.69 (Nst=1), aplicando distribución Gamma discreta (G= 4+Sitios Invariables) con un bootstrap de 1,00000, utilizando 45 secuencias de una longitud de 1269 nucleótidos que corresponden a la glicoproteína E2 del VEEV, la secuencia se encuentra en marco de lectura. En el Genoma completo se localiza entre los nucleótidos 8504 a 9832 en un sentido 5' a 3', el análisis se realizó con el programa UGENE.

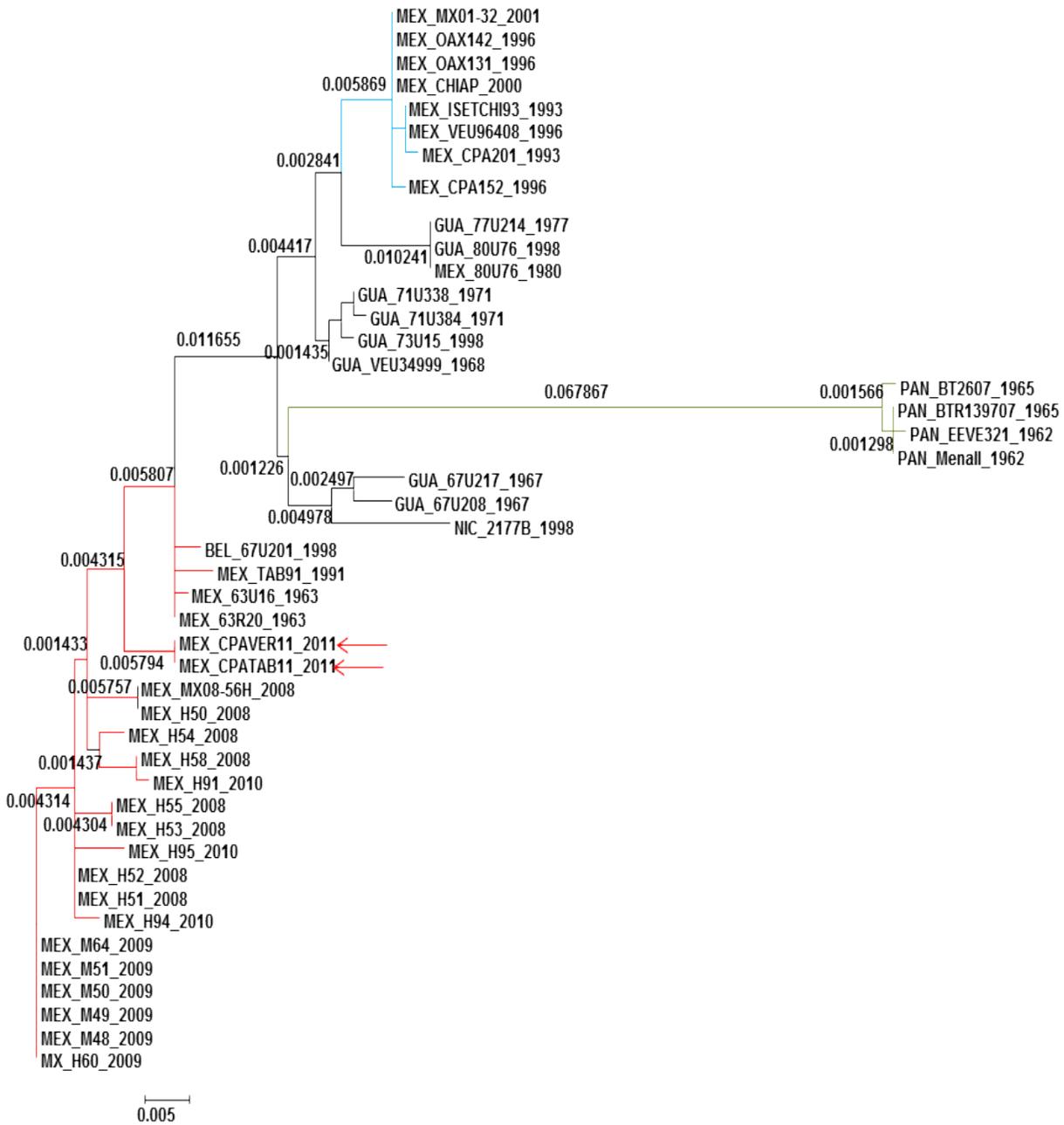


Figura 16. Árbol Filogenético elaborado con Hyphy para el subtipo IE usando el Gen E2 del Virus de Encefalitis Equina Venezolana. Reconstrucción filogenética realizada por el método Máxima Verosimilitud aplicando el criterio de Bayes con un bootstrap de 2000 replicaciones, utilizando el modelo de Tamura-Nei con distribución Gama más sitios invariables (5 categorías(G+I)). La inferencia topológica se realizó con el método heurístico ML/Nearest-Neighbor-Inter change (NNI), utilizando para ello 45 secuencias con una longitud de 1269 nt (nucleótidos) que corresponde a la glicoproteína E2 del VEEV lo anterior se realizó con el programa HYPHY (S.L. Kosakovsky Pond, S.D. W. Frost an S.V. Muse. (2005) HyPhy: hypothesis testing using phylogenies. *Bioinformatics* 21: 676-679).

3.2.2. Análisis subtipo IE con respecto a otros aislados circulantes en América

A fin de obtener más información respecto al subtipo IE y considerar un número mayor de secuencias se realizó una filogenia utilizando un fragmento de 703 pares de base de la glicoproteína. En la filogenia del fragmento IE observamos que los grupos ya establecidos se mantienen, sin embargo podemos observar un grupo más en donde se encuentran secuencias que corresponden a Nicaragua y Guatemala de 1967 a 1977.

El primer grupo que observamos en la filogenia es el de las Costas del Golfo de México con un valor de bootstrap de 0.00582, las secuencias en este clado presentaron un valor de similitud de 100% y comprenden el periodo de la epizootia de 1993 a 1996 se incluye una secuencia del 2001.

Para el caso de las secuencias de Nicaragua y Panamá se observa que parten de la cepa 67U208 aislada en 1967, el valor de la rama indica la similitud de los grupos formados. Las cepas de Panamá mantienen una estrecha relación evolutiva con respecto a las cepas de Guatemala y Nicaragua. En el caso de las cepas aisladas en este estudio del año 2011 la relación con la cepa 63U16 aislada en 1963 con un valor de soporte de 0.00430 se mantiene, así como el aislado MX08-56H con un valor de soporte de 0.00148, a su vez en este análisis se incluyen secuencias de muestras que se obtuvieron del 2008 a 2009 en México, los aislamientos se realizaron de hámster centinelas y mosquitos por Scott Weaver y colaboradores en 2011, el estudio de Weaver y colaboradores deja entrever la constante circulación del virus en su forma enzootica sin embargo aunque estas secuencias no forman grupos específicos observamos que en los aislados de mosquitos las secuencias muestran una similitud del 100%, no así para el caso de los aislados de hámster.

3.2.3. Análisis de los aislados del 2011

Dos cepas del VEEV, fueron tipificadas como IE y aisladas en México en el 2011; en clado (Fig. 13), estas cepas se identifican como CPAVER11 (KF562710) y CPATAB11 (KF562711). Al tomar el producto del RT-PCR para su secuenciación y reconstrucción filogenética con las cepas del virus, se evidencia que las cepas aisladas formaron un grupo monofilético con las cepas 63U16 y MX08-56H, los aislados del VEEV obtenidos durante 2011 están estrechamente relacionadas con las cepas IE aisladas en 1963 y 2008 de hámster

centinelas, considerándose la circulación endémica del VEEV de tipo enzoótico en las Costas del Golfo de México. Estos aislados corresponden a cepas endémicas/enzooticas, variedad IE, sugiere que los ciclos silvestres para la EEV se mantienen de forma continua y con intensidad variable, ya que en este caso también podemos observar la capacidad del virus para infectar equinos, esto dependiendo de ciertas condiciones ambientales, ecológicas y climatológicas.

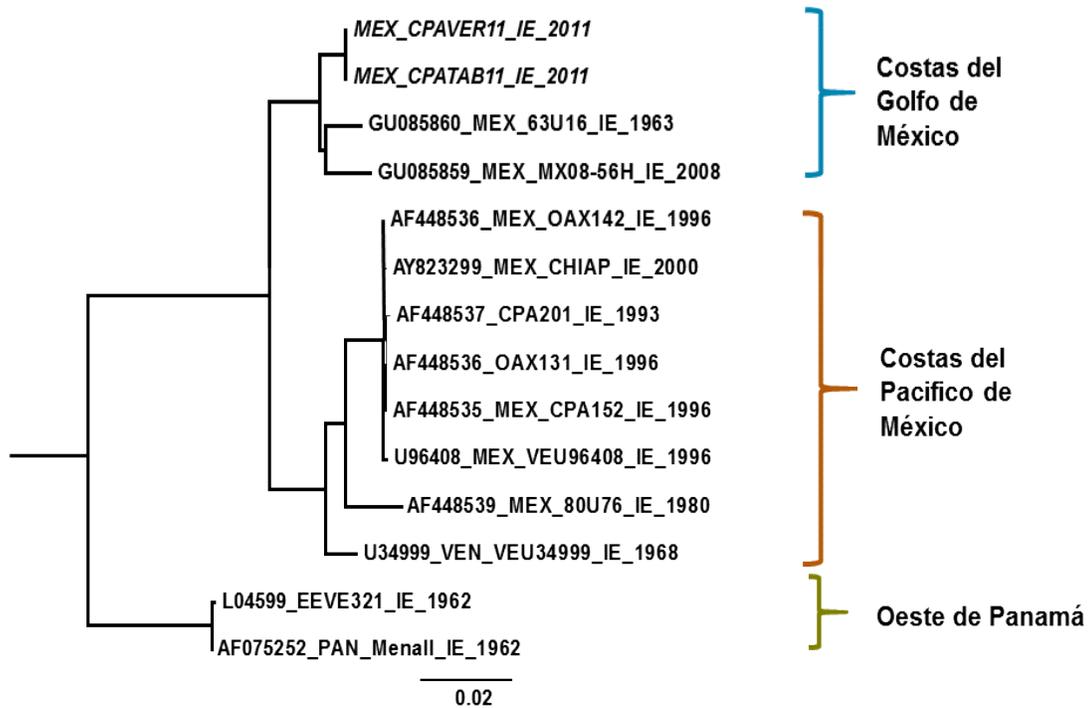


Figura 17. Linajes del subtipo IE. Fragmento del árbol HYPHY donde se muestran los tres linajes en los cuales se divide el subtipo IE, se aprecia que los aislados del 2011, utilizados en este trabajo se agrupan en el linaje la Costa del Golfo de México.

3.2.4. Análisis de redes incluyendo todos los subtipos

La diversidad nucleotídica (π) fue de 0.18737, con un número de sitios segregantes (θ) de 0.17568 y una diversidad Haplotípica (HD) de 0.9864. El número total de mutaciones disgregadas en el torso es de 1790, el número estimado de mutaciones del árbol entre las ramas del torso es de 1540, El número total de secuencias utilizadas para el análisis es de 87 secuencias las cuales formaron 72 haplotipos. En la red se observa un agrupamiento muy específico en cuanto al subtipo epizoótico en este caso IAB y IC, se aprecia que existe una menor cantidad de aislados ya que la mayoría de estas secuencias

corresponden a la epizootia de 1989 a 1972 en este caso no hay un patrón específico en cuanto al tropismo del subtipo IAB hacia algún hospedero ya que afecta de forma indiscriminada a varias especies no así para el subtipo IC, la relación de las cepas enzootica y epizootica se da por dos haplotipos que pertenecen al subtipo IE la diferencia entre estos es de una mutación en el sitio 250, a partir de ahí se observa que entre cada uno de los subtipos existen un grado elevado de conservación sobre todo para los subtipos enzooticos al presentar pocas mutaciones (Anexo I), se aprecia que en el caso de las cepas enzooticas se observan patrones en cuanto a su circulación en ciertos hospederos tal es el caso del subtipo IE que es el que se ha comprobado que circula en México, en donde de forma silvestre el virus principalmente se ha aislado de mosquitos y hámster centinela aunque también se ha aislado de equinos y humanos, en el caso del subtipo IIIA vemos que este circula principalmente en el mosquito aunque también en monos y entre estos subtipos se observa que tiene un relación evolutiva muy estrecha, la relación de la red así como la asociación de los genotipos dada principalmente por el hospedero del cual fue aislado el virus, de alguna forma podrían explicar tanto la evolución de las cepas enzooticas del virus como la preservación de ciertos genotipos, esto es que se pueden mantener periodos de estasis evolutivo y se mantiene el genotipo casi sin cambios algunos durante un periodo de tiempo largo.

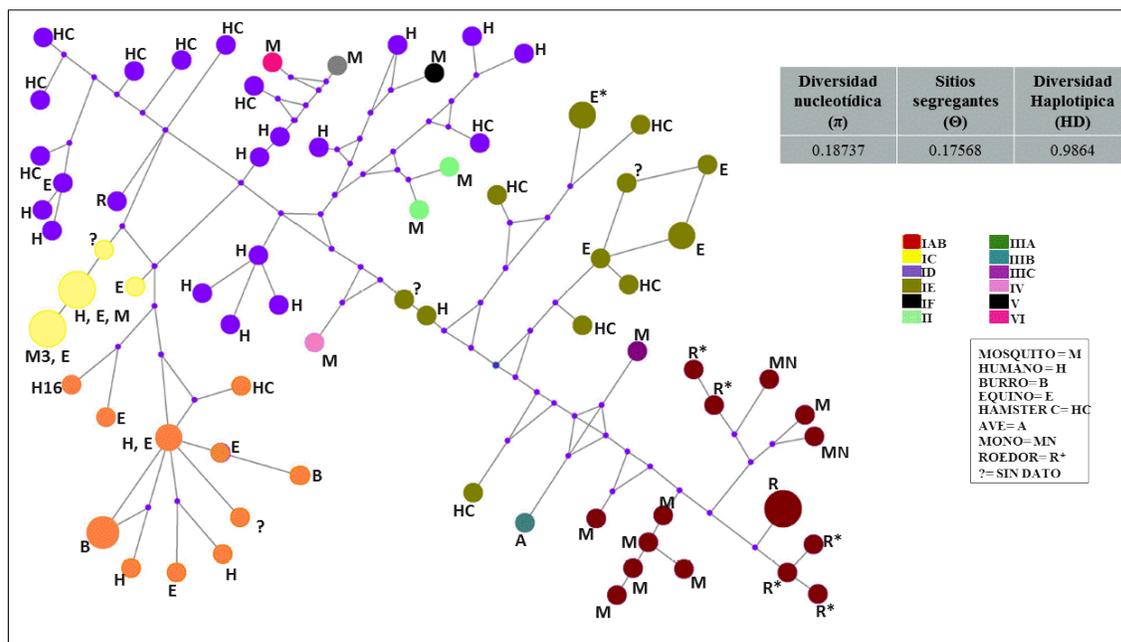


Figura 18. Red filogenética del VEEV incluyendo todos los subtipos. Se muestra una red filogenética en donde observamos una relación evolutiva más específica del complejo del Virus de Encefalitis Equina Venezolana, claramente podemos ver que la relación de los distintos genotipos del virus está dada por el hospedero, el análisis se realizó en el programa Network.

3.2.5. Análisis de redes subtipo IE fragmento.

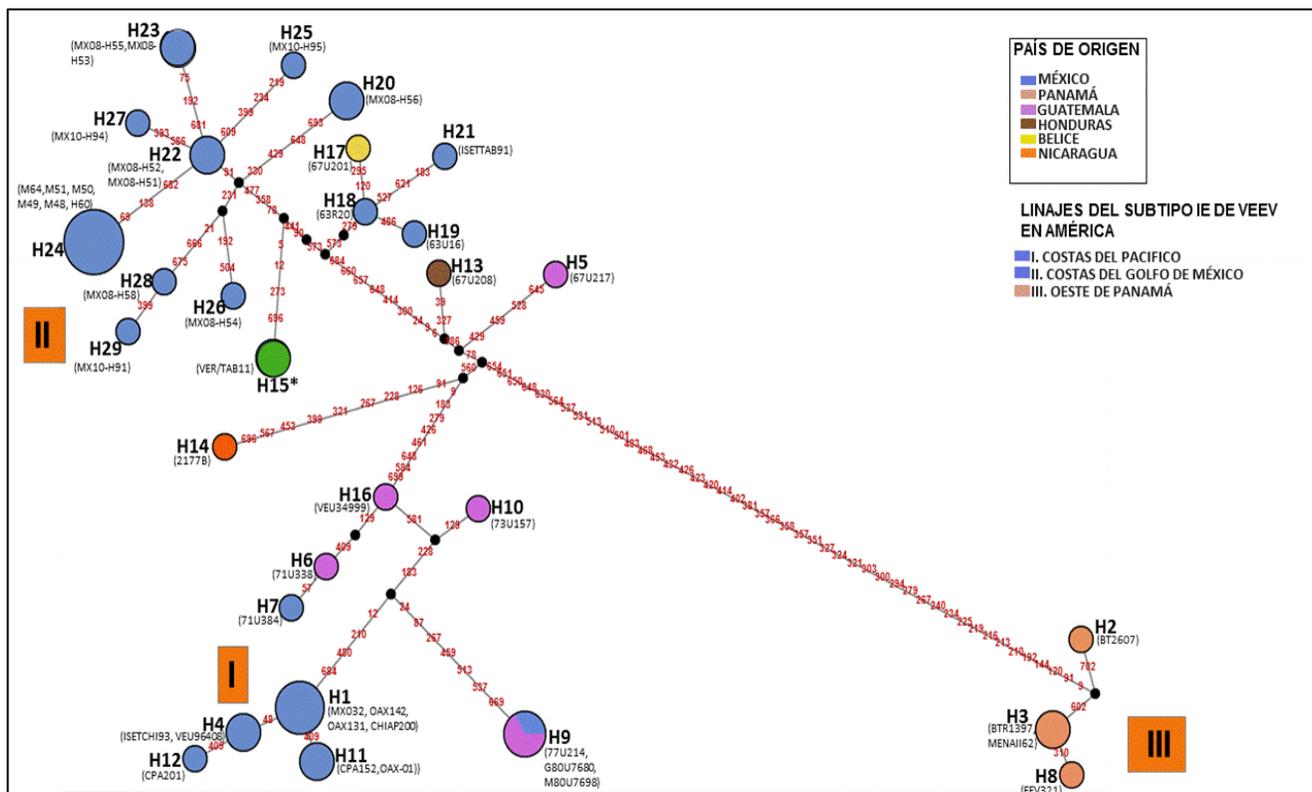


Figura 19. Red filogenética del Virus de Encefalitis Equina Venezolana para el subtipo IE. Se aprecia la red elaborada para el subtipo IE en donde observamos que la mayoría de las cepas aisladas pertenecen a México que son los círculos en color azul, a su vez observamos la división de los linajes de las Costas del Golfo de México, las Costas del Pacífico de México y las del Oeste de Panamá, en verde observamos los aislados utilizadas en este trabajo, se elaboró con un fragmento de 703 pares de bases de la glicoproteína IE, el análisis se realizó en el programa Network.

El número total de mutaciones disgregadas en el torso es de 105, la estimación de mutaciones de las ramas entre el torso fue de 263, para el análisis se utilizaron 53 secuencias que formaron 35 haplotipos. La diversidad nucleotídica (π) fue de 0.9768, con un número de sitios segregantes (τ) de 0.08118 y una diversidad Haplotípica (HD) de 0.97668. El análisis muestra una topología muy parecida a la obtenida con los árboles filogenéticos, manteniéndose los tres linajes sin embargo, entre los linajes ya establecidos se mantiene un número bajo de mutaciones entre estos, los haplotipos que muestran un tasa mayor de mutaciones corresponden a las costas del Pacífico. Como se observó en la imagen para el caso del subtipo IE, los genotipo se mantienen tanto por los hospederos como por la región donde estos circulan y tenemos tres grupos muy marcados que son los de las Costas del Golfo de México que representan una mayor diversidad, los otros dos linajes tal es el

caso de los haplotipos que conforman el linaje de las Costas del Pacífico y el menos diverso es el del Oeste de Panamá, en donde evolutivamente hablando es más lejano a los haplotipos circulantes en México. Con respecto a los haplotipos de otros países del sureste es el caso de Perú, Belice, Guatemala y Nicaragua, que están estrechamente relacionados con los haplotipos circulantes en México sobre todo los de las Costas del Golfo. Este análisis muestra rutas evolutivas más específicas, con respecto a las cepas 63U16 (que fue aislado en el año de 1963 en México de un hámster centinela), la cepa MX08-56 (que también se obtuvo de hámster centinela) y los aislados del 2011 de Veracruz y Tabasco (que se aislaron de equinos). En la figura se observa que la cepa 63U16 presenta 10 mutaciones según el análisis con cuatro ancestros, para el caso de la cepa MX08-56 la diferencia es alrededor de 12 mutaciones, la diferencia entre la cepa MX08-56H y los aislados 2011 es de 11, por lo tanto la relación evolutiva más cercana es entre el virus aislado de 1963 y los aislados de 2011 (Figura 19). Sin embargo también podemos ver que el virus que fue aislado en 1963 se encuentra circulando en las Costas del Golfo de México y aunque el genotipo se mantiene casi sin cambios significativos, también podemos inferir que cuenta con el potencial para generar variantes patógenas que pudieran provocar epizootias que afecten principalmente a equinos y humanos. Como observamos las variantes que circulan en México refiriendo específicamente a las secuencias que conforman el linaje de las Costas del Golfo, podemos ver que aunque es un grupo más diverso la mayoría de aislados corresponden a hámster centinela o mosquitos, lo cual es relevante ya que las cepas aisladas en el 2011 pertenecen a equinos, este es un comportamiento del virus que no se había observado al menos para esta región. En el análisis de redes podemos ver que la localización de los dos linajes del VEEV en México está geográficamente bien delimitada, esto probablemente se deba a la interferencia de barreras naturales tal como es la sierra madre del sur y el río Balsas, esto únicamente para los aislados de las Costas del Pacífico que corresponden a los estados de Guerrero y Oaxaca en donde hay más registros de casos en equinos y humanos, lo que podría explicar las diferencias entre estos y las cepas que circulan en las Costas del Golfo de México. Por lo tanto es necesario tener una constante vigilancia mediante el muestreo en campo de zonas donde se ha comprobado la circulación del virus, y así tener una mayor certeza de los distintos genotipos que circulan en nuestro país.

3.3. Análisis evolutivo

Para realizar este análisis se utilizaron 88 secuencias que corresponden al VEEV que se obtuvieron en GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) dentro de este set de secuencias incluimos las secuencias de los aislados de este trabajo, las secuencias fueron alineadas utilizando el programa de MEGA y posteriormente cortadas en marco de lectura abierto, obteniendo un fragmento de 1,269 pb que conforman el gen E2. Realizando la comparación de secuencias tenemos 551 sitios invariables (monomórficos), encontrando 712 polimorfismos (segregantes) y 363 números de sitios polimórficos. El estimado de transición / transversion (**R**) es de 3.37. El patrón de sustitución y las tasas se calcularon bajo el modelo Tamura-Nei (**G+ I**) (Tamura K, Nei M., **1993**). Una distribución gamma discreta se utilizó para modelar las diferencias evolutivas entre los diferentes tipos de sitios (5 categorías, [+ G], parámetro = 1,0686). El modelo de la tasa de variación permitido para algunos sitios a ser evolutivamente invariables ([+ I], sitios 37.9009 %). Las frecuencias de nucleótidos fue A = 26.25 %, T / U = 22.39 %, C = 26.70 %, y G = 24.65 %.

La probabilidad de registro máximo para este cálculo fue -13207,392. Las posiciones de codón incluidos fueron 1^a, 2^a, y 3^a + sitios no codificantes. Todas las posiciones que contienen lagunas y los datos faltantes fueron eliminados, hubo un total de 1255 posiciones en el conjunto de datos final. El Análisis evolutivo se llevó a cabo con MEGA5.

Tabla V. Estimación de Máxima Verosimilitud, compuesto del patrón de sustitución de nucleótidos

Bases nucleotídicas¹	A	T	C	G
A	-	1.62	1.94	17.92
T	1.91	-	26.38	1.78
C	1.91	22.04	-	1.78
G	19.16	1.62	1.94	-

1. Son moléculas las cuales resultan de la unión de un monosacárido de cinco carbonos, una base nitrogenada y un grupo fosfato, el ADN se confirma por cuatro bases nucleotídicas que son Adenina (A), Timina (T), Citosina (C) y Guanina (G).

Al realizar el estudio de una serie de datos que en este caso son las secuencias de nucleótidos y a su vez, elaborar con éstas un análisis filogenético, éstos tienen que ser sometidos a un ajuste del modelo y determinación de sus parámetros, lo que se denomina como estimación por máxima verosimilitud. Por ello se determina la probabilidad de sustitución nucleotídica de nuestras secuencias. Cada entrada muestra la probabilidad de sustitución (r) de una base (fila) a otra base (columna). Por simplicidad, la suma de los valores de “ r ” se hace igual a 100. Las tasas de las diferentes sustituciones transitorias que se muestran en negrita y las de sustituciones transversiones se muestran en cursiva. Las frecuencias de nucleótidos son 26.28 % (A), 22.36 % (T / U), 24.59 % (C), y 26.77 % (G).

3.3.1. Prueba De Tajima

Para descartar que en las secuencias se esté dando un proceso evolutivo neutral es necesario utilizar la prueba de Tajima, esto para detectar que algún tipo de selección esté actuando sobre alguna regiones del genoma, rechazando para ello la hipótesis de neutralidad. Específicamente esta prueba se determina entre los estimadores Π y Θ , en donde si D resulta negativa quiere decir que el valor de Θ es mayor al de Π , lo que nos estaría hablando de la presencia de mutaciones deletéreas; si en cambio D resulta positiva quiere decir que Π tiene un mayor valor que Θ indicando que algunos alelos se encuentran bajo selección positiva.

En nuestras secuencias observamos que el valor de la prueba estadística de Tajima es de 2.427811 (Tabla VI) por lo cual podemos rechazar la hipótesis de neutralidad, considerando también que el valor positivo nos habla de bajos niveles de polimorfismos de baja y alta frecuencia lo que indica una disminución en el tamaño de la población o en el equilibrio de la selección.

Tabla VI. Prueba de neutralidad de Tajima

m^1	S^2	Θ^3	Π^4	D^5
88	701	0.110632	0.188704	2.427811

1. Número de secuencias
2. Número de sitios segregantes
3. p/a
4. Diversidad nucleotídica
5. Prueba estadística de Tajima

Posteriormente utilizando las tasas de DS y DN se determinó la presión de selección real. Los valores de la prueba de presión de selección con el programa DNAsp, nos indica que el número de sitios sinónimos es de 313.22 con un valor $P_i(s)$ de 0.55844, y los sitios no sinónimos 946.70 con un valor $P_i(a)$ de 0.06475. Por lo tanto tenemos que DS/DN (mutaciones sinónimas/mutaciones no sinónimas) es 0.115948 utilizando un valor de significancia $p > 0.10$. Si consideramos la ω (dN/dS) relación entre la tasa de cambio de mutaciones no sinónimas y no sinónimas, si obtenemos valores de $\omega < 1$ las mutaciones no sinónimas son deletéreas y la selección natural impide su fijación, por lo tanto hablamos de una selección de tipo negativa y esta ocurre en la mayoría de los genes funcionales. Si $\omega = 1$ entonces estamos hablando de que todas las secuencias son neutrales (Pseudogénesis). En caso contrario si $\omega > 1$ se considera la selección positiva en donde las mutaciones no sinónimas son favorables y se fijan por la misma selección y esto ocurre en unos pocos genes funcionales. Tomando en cuenta lo anterior, podemos determinar que la selección de tipo negativa es la que mayormente está influyendo en el gen E2, ya que el valor que obtenemos es $\omega < 1$, sin embargo considerando que el cálculo del tipo de selección que se realizó fue de manera global, no se descarta la posibilidad que en algunos codones pudieran estar afectados por selección positiva.

3.3.2. Resumen de la comparación de secuencias de aminoácidos

Para realizar la comparación de aminoácidos y ver qué tan consistentes eran las secuencias se realizó un alineamiento utilizando secuencias de todos los subtipos, en este caso se utilizaron 88 secuencias en marco de lectura de una longitud de 404 aminoácidos, se observaron pocos cambios en la región de la Glicoproteína E2 una vez identificados los cambios realizando el análisis en todos los subtipos del complejo del VEEV y basándonos en la filogenia; como se describió anteriormente los aislados del 2011 se agruparon con el subtipo IE, resultando importante mostrar estas diferencias haciendo mayor énfasis en las secuencias IE; por lo tanto se presenta un resumen de los cambios registrados para este subtipo, las variaciones que se muestran en el cuadro VII son mínimos si comparamos la cantidad de residuos de aminoácidos contra la distancia en tiempo.

Tabla VII. Resumen de los cambios de aminoácidos consistentes entre los genotipos del subtipo IE del VEEV.

		POSICION DE LOS AMINOACIDOS							
<i>Número de acceso</i>	<i>CEPA</i>	117	134	218	303	357	377	407	413
-	VERACRUZ ¹	E	V	S	E	T	I	R	A
-	TABASCO ¹	E	V	S	E	T	I	R	A
GU085860	63U16 ¹	E	V	S	E	T	I	R	A
GU085859	MX08-56H ¹	E	V	S	E	K	I	R	A
AF448538	OAX142 ¹	E	A	N	E	T	I	R	A
AY823299	CHIAP ¹	E	A	N	E	T	I	R	A
U96408	VEU96408 ¹	E	A	N	E	T	I	R	A
AF448537	CPA201 ²	K	A	N	E	T	I	R	A
AF448536	OAX 131 ²	K	A	N	E	T	I	R	A
AF448535	CPA152 ²	K	A	N	E	T	I	R	A
U34999	VEU34999 ³	E	A	S	E	T	I	S	A
AF448539	80U76 ³	E	A	S	D	T	L	R	V

1. Cepas que corresponden al linaje de la Costa del Pacífico de México

2. Cepas que corresponden al linaje de la Costa del Golfo de México

3. Cepas del Oeste de Panamá

Los cambios analizados son específicamente para el subtipo IE, observando que las cepas que se agrupan dentro de un mismo linaje se conservan casi sin cambio alguno en su genoma.

En cuanto a los linajes podemos observar que en el caso de las secuencias que se comparan para el caso de los aislados de Panamá son secuencias similares en aminoácidos y esto tal vez se debe que las tasa de sustitución nucleotídica en el VEEV son bastante, considerando también que estas secuencias pertenecen a un brote y en este caso por lo regular se trata del mismo virus, además de que la distancia en tiempo es mínima. Para el caso de las secuencias del Pacífico de México, se observa que la secuencia no es del todo

estable ya que presenta cambios sustanciales, sin embargo estos cambios ocurren aunque se trate del mismo hospedero, en el caso de los aislados AF448538, AF448537, AF448536, AF448535 que pertenecen al brote de 1993 a 1996 solo se presenta un cambio en el aminoácido 117 de K→E que comparando con la secuencia más antigua de este linaje (AF448539) presenta cinco cambios de aminoácidos. Para las secuencias que pertenecen a las costas del Golfo de México, el cambio que se observa es en la secuencia GU085859 que corresponde a la cepa MX08-56H, donde se observa que el aminoácido 347 existe un cambio de T→K, aunque este cambio esté presente no se puede inferir que sea el responsable en el aumento o disminución de la virulencia del virus ya que esta cepa fue aislada de un hámster en estado silvestre. En lo que se refiere a la cepa 63U16 en comparación con los aislados del 2011 no existen cambios significativos, lo cual se debe al tipo de selección que está actuando sobre el virus, lo que a su vez no indica que las mutaciones que se generan no son fijadas a fin de conservar el genoma de los fenotipos del virus mejor adaptados a la zonas endémicas con el fin de preservar el linaje.

3.3.3. Gen E2 subtipo IE comparación de nucleótidos (secuencias representativas y de interés)

Se realizó la comparación de secuencias de nucleótido para las secuencias relacionadas directamente con los aislados del 2011 resultado del análisis filogenético, específicamente la cepa 63U16 que es la más lejana en tiempo a nuestras secuencias, esto es 48 años. Los cambios encontrados se resumen en la tabla VIII, observamos que en un fragmento de 1969 nucleótidos se encuentran 19 cambios los cuales corresponden en su totalidad a mutaciones puntuales o transiciones, lo cual nos da un preámbulo evolutivamente hablando de porque el virus ha permanecido en la región del Golfo durante casi cuarenta años ya que la mayoría de mutaciones que se generan no son fijadas a fin de mantener la circulación del virus, confirmando así que el VEEV circula de forma enzootica endémica entre pequeños mamíferos y mosquitos, en algunas regiones de México tal es el caso de las Costas del Golfo.

Tabla VIII. Cambios de nucleótido entre las secuencias de Veracruz y Tabasco aisladas en 2011 y la cepa 63U16

Posición del nucleótido	6	1	9	2	2	4	4	5	6	7	7	8	8	8	9	9	9	9	1
CEPA 63U16¹	C	T	G	T	C	C	G	T	T	T	C	A	A	C	C	T	C	T	A
VERACRUZ 2011²	T	C	A	C	T	T	A	C	C	C	T	G	G	T	T	C	T	C	G
TABASCO 2011²	T	C	A	C	T	T	A	C	C	C	T	G	G	T	T	C	T	C	G

1. Cepa aislada en el año de 1963

2. Cepas aislada en el 2011 de la presente investigación

Realizando una comparación del alineamiento de secuencias del subtipo IE utilizando 14 secuencias dentro de las cuales se encuentran los tres linajes se reportan 158 mutaciones estas en un fragmento de 1361 nucleótidos lo cual nos indica que aproximadamente 12.5 % del genoma que conforma la glicoproteína E2 está sometido a presión de selección. En cuanto a los aislados del 2011 podemos observar que comparando con la cepa 63U16 aisladas en 1963 presenta un número mínimo de mutaciones, la mayoría son transiciones y de estas se detectaron 19 sitios polimórficos solo para estas secuencias.

3.3.4. Matriz de identidad (UGENE)

Al realizar la visualización de las secuencias en el programa UGENE se puede obtener una matriz de identidad la cual mide la similitud de las secuencias en base a la comparación de nucleótidos que presenta cada una de ellas obteniendo así una matriz de identidad. Se realizó este procedimiento usando 89 secuencias con todos los subtipos, en la tabla IX se muestran los datos obtenidos únicamente para las secuencias que corresponden al subtipo IE y que pertenecen a México, las cepas aislada en 2011 en Veracruz y Tabasco muestran una similitud del 100% con la cepa 63U16 (GU085860) aislada en 1963 en México. Por otro lado observamos que la cepa MX-08 (GU085859) aislada en el 2008 presenta un porcentaje de similitud del 98.8 % con respecto a los aislados del 2011 por lo cual se podría sugerir que la cepa 63U16 es el ancestro más cercano a los aislados 2011 tomando en consideración que realizando una filogenia por método de distancia específicamente el método UPGMA, de igual forma sugiere que la cepa

63U16 pudiera el ancestro directo de los aislados del 2011. Estos datos no ayudan a corroborar la semejanza entre los aislados del 2011 y la cepa 63U16, ya que la posibilidad de que la cepa MX-08 aislada en el año 2008, en tiempo es más cercana a nuestros aislados el número de mutaciones es mayor, inclusive en la comparación de aminoácidos observamos que hay un cambio, y siguiendo el principio de parsimonia es evidente que es más probable la relación de los aislados del 2011 con la cepa 63U16

Tabla IX. Matriz de identidad en base a la comparación de secuencias de nucleótidos del subtipo IE

	VERACRUZ	TABASCO	AF448538	AF448537	AF448536	AF448535	AY823299	AF448539	GU085860	GU085859	U34999
VERACRUZ		100%	99.5%	99.3%	99.3%	99.3%	99.3%	99.1%	100%	99.8%	99.5%
TABASCO	100%		99.5%	99.3%	99.3%	99.3%	99.3%	99.1%	100%	99.8%	99.5%
AF448538	99.5%	99.5%		99.8%	99.8%	99.8%	99.8%	99.1%	99.5%	99.3%	99.5%
AF448537	99.3%	99.3%	99.8%		100%	100%	99.5%	98.8%	99.3%	99.1%	99.3%
AF448536	99.3%	99.3%	99.8%	100%		100%	99.5%	98.8%	99.3%	99.1%	99.3%
AF448535	99.3%	99.3%	99.8%	100%	100%		99.5%	98.8%	99.3%	99.1%	99.3%
AY823299	99.3%	99.3%	99.8%	99.5%	99.5%	99.5%		98.8%	99.3%	99.1%	99.3%
AF448539	99.1%	99.1%	99.1%	98.8%	98.8%	98.8%	98.8%		99.1%	98.8%	99.1%
GU085860	100%	100%	99.5%	99.3%	99.3%	99.3%	99.3%	99.1%		98.8%	99.5%
GU085859	99.8%	99.8%	99.3%	99.1%	99.1%	99.1%	99.1%	98.8%	99.8%		99.3%
U34999	99.5%	99.5%	99.5%	99.3%	99.3%	99.3%	98.3%	99.1%	99.5%	99.3%	

Matriz que indica el porcentaje de identidad entre secuencias de nucleótidos, en esta tabla se muestra un resumen de los resultados específicos para el subtipo IE, la matriz se obtuvo con el programa UGENE.

3.3.5. Encefalitis equina venezolana en México.

En México, se ha identificado la circulación del subtipo IE y este se limita únicamente en la parte centro de América, particularmente en México el último reporte de la enfermedad en equinos ante la OIE fue en el año de 1996, donde ocurrió una pequeña epizootia, en la cual se aisló el virus y este fue tipificado como subtipo IE, estudios posteriores de estos aislados lograron identificar una mutación a nivel de la glicoproteína E2, en donde un solo cambio aminoacídico le confería al virus mayor eficiencia para infectar al vector lo cual podría explicar la diseminación del virus durante la epizootia, estas cepas fueron aisladas en los estados de Oaxaca y Veracruz, en este caso el virus aislado se agrupó en el linaje de las costas del Pacífico, después de estos no se había dado ningún reporte oficial sobre equinos enfermos o muertos por EEV, sin embargo del 2003 al 2011 se nota una circulación constante tanto en la región de las costas del Golfo como en las costas del Pacífico, es decir que se han registrado algunos casos aislados tanto en equinos como en

humanos, lo cual sugiere que las cepas que circulan en México tiene el potencial para en algún momento desarrollar una epizootia, sumando a estos las condiciones climáticas y los desastres naturales que conllevan a la movilización y aumentó de las poblaciones principalmente de los vectores. Específicamente para el caso de la distribución de los dos linajes que circulan en México, podemos ver que tanto que las condiciones climáticas así como también la distribución de las especies que se han descrito como hospederos y vectores son las mismas, además de que son varias las especies involucradas y no se ha descrito una especie específica tanto para hospedero como vector, solo hay una excepción para el brote que se registró en 1993-1996 ya que en este caso la especie que se sospecha fue la responsable de infectar a los equinos fue *Aedes taeniorhynchus* que es uno de los principales vectores para algunas cepas de tipo epizoótico, que a diferencia de estudios indican que el principal vector el *Culex (Melanoconion) taeniopus*.

Los datos más recientes en México sobre casos del VEEV, en el 2003 según los anuarios de epidemiología de la Secretaria de Salud, se registró el caso de un niño de 1 a 4 años que murió, presuntamente por EEV ya que no se realizó diagnóstico diferencial. Según datos no publicados de Estrada-Franco J. y Weaver S., del 2009 al 2011 se registra la circulación del VEEV en los estados del sureste del país, los estados afectados con casos aislados del EEV en equinos son Chiapas, Tabasco, Veracruz y Yucatán. En el caso de estas infecciones tanto en equino como en el humano estas fueron causada por virus enzoótico del subtipo IE. El último reporte de un brote por EEV fue en la panzootia de 1996 a 1993. En la figura 21 se muestran los estados en los cuales se presentaron casos aislados del 2003 al 2011 tanto en equinos como en humanos.

CASOS RECIENTES DE ENCEFALITIS EQUINA VENEZOLANA EN MÉXICO



FUENTE: Datos no publicados CPA (Comisión México Estados Unidos para la prevención de la Fiebre Aftosa y otras enfermedades exóticas en animales) y Secretaría de Salud (2011).

Figura 21. Casos recientes de Encefalitis Equina Venezolana en México. Se describen los casos que del 2003 al 2011 han afectado tanto a equinos como humanos, se observa una mayor incidencia en los estados que se encuentran en la Costa del Golfo de México, principalmente Veracruz y Tabasco los casos que se muestran en el mapa fueron provocados por el subtipo IE..

En México es difícil conocer la situación real respecto a la presencia del VEEV, ya que es una enfermedad que genera cuadros patológicos muy similares a otras enfermedades provocadas por arbovirus, y al no poder realizar un diagnóstico diferencial la EEV suele confundirse con otras enfermedades como el dengue, tal y como lo confirman datos de Aguilar y colaboradores en el 2011. Además de que no existen trabajos que sean muy específicos para poder discernir entre que especies son las que están jugando un papel muy importante para la mantención del ciclo de las cepas enzoóticas IE que circulan en México tanto de hospederos como de vectores. Por lo cual se requiere estudiar los aspectos ecológicos que involucran al VEEV en México.

4. DISCUSIÓN

El conocimiento sobre la distribución de VEEV es muy importante para el desarrollo de estrategias para su control, de ahí la importancia de estudiar y determinar la dinámica de su diseminación, así como determinar la presencia y distribución de genotipos a nivel nacional y mundial. La determinación de análisis filogenéticos, como apoyo a las herramientas de diagnóstico nos brinda elementos útiles en la aplicación adecuada de

estrategias de prevención. Los análisis filogenéticos así como las pruebas de biología molecular son útiles para tener un certeza en el diagnóstico de los virus, sin embargo las filogenias nos permiten dar seguimiento y tener la posibilidad de predecir nuevos brotes, en base a las asociaciones evolutivas que se logran identificar con ellos, estableciendo así estrategias de vigilancia epidemiológica que sean más específicas (**Holmes** 2006). Con este objetivo se ha estudiado la región de la glicoproteína E2 del virus de dos aislados uno de Veracruz y otro de Oaxaca para determinar su subtipo y genotipo y por lo tanto definir los patrones de dispersión de este virus. Estudios previos del VEEV sugieren la capacidad de que a partir de las cepas enzoóticas se pueden generar variantes epizooticas provocando así epidemias y epizootias, sin embargo hasta el momento no se han podido identificar marcadores específicos en nucleótido y aminoácidos que pudieran explicar los eventos de reemergencia. Tal es el caso de las cepas aisladas durante la reemergencia de 1993 a 1996 en México que fueron tipificadas como subtipo IE, estos estudios demuestran la capacidad del virus para mantener su linaje ya que las cepas difieren solo en un 2% con respecto a las cepas que circulan en Guatemala, a pesar de la capacidad de infectar equinos cuando estos aislados son inoculados en cobayos no muestran diferencias significativas en el aumento de virulencia, comparadas con otras cepas del subtipo IE enzoóticas, a su vez los cambios encontrados a nivel de la glicoproteína E2 sugieren que un cambio en la posición 213 es responsable de que las cepas enzoóticas produzcan fenotipos epizootico (**Brault et al.**, 2002). En cuanto a los aislados del 2011 no se registra este cambio en la comparación de aminoácidos muy posiblemente a que cada linaje circulante contiene características específicas o polimorfismos dependiendo de la región donde este circule.

Los análisis realizados en el presente estudio, en el caso de la reconstrucción filogenética, se distingue un comportamiento cíclico de reemergencia que se establece en aproximadamente 42 a 48 años, este comportamiento se observa más específicamente en cepas enzoóticas como bien lo reflejan los aislados del 2011, para el caso de los subtipo IE de México y IIIA que se distribuye en Trinidad y Tobago. Con respecto a cepas asiladas en 2007 donde se ve el mismo patrón evolutivo ya que la cepa TRI65 aislada en 1965 es el ancestro más cercano las cepas aisladas en 2007, manteniendo un periodo de estasis de al menos 42 años. Circulando así de forma enzoótica-endémica algunos de los linajes tanto para el subtipo IE como el subtipo IIIA, manteniendo a su vez una estrecha relación

evolutiva entre estos. Datos previos de Powers y colaboradores de 1997 confirma esta relación.

En el caso particular de México, el porcentaje de identidad de las cepas aisladas de equino infectados y que murieron en 2011 con la cepa 63U16 aislada en 1963, con un valor superior de 50 %. Los datos evolutivos confirman esta relación, analizando la matriz de identidad, podemos ver que el porcentaje de similitud entre las cepas aisladas en 2011 presenta una identidad del 100% con respecto a la cepa 63U16. Lo cual sugiere que los casos aislados de EEV EN México del 2009 al 2011 son directamente reemergencia de la cepa 63U16, ya que aunque estos aislados tienen una estrecha relación con los aislados de 2008, el porcentaje de identidad en la matriz es aún mayor con la CEPA 63U16 que con la cepa MX08-H56 aislada en 2008 de hámster centinela.

La circulación del virus en forma enzootica en la regiones de la costa del Golfo también es reportada de 2008 a 2010, mediante aislados de hámster centinela (**Aguilar et al.**, 2011). La comparación de las secuencias de aminoácidos con respecto a los aislados 2008 a diferencia de las secuencias analizadas muestra un cambio de aminoácido en la posición 357 de T→K, este cambio no se asocia a un aumento de la patogenicidad o severidad de la enfermedad, estos resultados sugieren que posiblemente los aislados del 2008 pertenece a algunas variantes virales con la capacidad de provocar casos aislados del virus, que no necesariamente se ven reflejado en epizootias o epidemias, esto probablemente debido a una dinámica de cuasiespecies, ya que en este caso el espectro de mutantes, específicamente las variantes con mayor capacidad de infectar o más virulentas, suelen presentarse de forma efímera para posteriormente desaparecer. Datos previos de Wang y colaboradores sugieren una dinámica de cuasiespecies en donde las cepas enzooticas probablemente presentan la capacidad de generar variantes epizooticas (**Wang et al.**, 1999).

Sin embargo si consideramos que en el caso de las cuasiespecies virales el genoma tiene que ser distinto y en este caso el porcentaje de identidad entre las cepas 2011 y 63U16 es idéntico en un 100%, podemos sugerir que se trata de una reemergencia del virus de 1963, otra pruebas que apoyan este hecho es que la secuencia en aminoácidos es igual en al menos a la glicoproteína E2, considerado que este fue aislado en el 2011 es posible inferir

que este virus ha estado de manera endémica en México por lo menos 48 años y la única diferencia a nivel de E2 son sustituciones de tipo sinónimas. Por otro lado los valores de DN/DS (mutaciones no sinónimas/ mutaciones sinónimas) es de 0.037, indican que la selección negativa es de la principales fuerzas evolutivas actuando sobre este virus, en favor de la preservación de los fenotipos mejor adaptados en las zonas endémicas, lo que ayuda a explicar la estabilidad del linaje por 48 años. Ahora si consideramos en sentido estricto la definición y clasificación de los subtipos del complejo de VEEV, los casos aislados de equino demuestran el potencial para que la cepa IE clasificadas como enzooticas desarrolle variantes fenotípicas que se reflejen en cuadros severos de la enfermedad que causan la muerte en equinos, tal es el caso de los equinos afectados del 2009 al 2011 en los estados de Veracruz y Tabasco, así como el caso del 2003 de un niño que falleció muy posiblemente a causa de esta enfermedad en Veracruz, lo cual nos da indicios de su capacidad infectiva, ya que en trabajos recientes se demuestra la capacidad del virus de cepas enzooticas que han provocado daños en humanos tal es el caso del subtipo ID, tal como lo reportan Vilcarromero y colaboradores en 2009, donde aislaron el virus de un niño el cual desarrollo una enfermedad sistémica febril acompañada de un cuadro gastrointestinal, se analizó la región de la glicoproteína E2 y se encontraron dos cambios en la composición aminoacídica (**Vilcarromero et al.**, 2009). Sin embargo se requieren más estudios para corroborar que estos cambios realmente puedan asociarse tanto al tropismo hacia ciertos hospederos como a la severidad de la enfermedad. Como se mencionó anteriormente, los aislados del 2011 de Tabasco y Veracruz no presentan cambios considerables a nivel de la glicoproteína que nos den indicios del comportamiento del virus, esto debido al tipo de evolución que está actuando sobre el virus, ya que los valores de DN/DS (mutaciones no sinónimas /mutaciones sinónimas) de 0.037 nos indica, que la selección es de tipo negativa, que es una de las principales fuerzas evolutivas que están actuando sobre esta. Sin embargo será necesario estudiar otras regiones del genoma de este virus como por ejemplo la glicoproteína proteína NSP3 donde se han encontrado cambios sustanciales que podrían resultar en modificaciones de las funciones del virus. Con base en esto podemos inferir que algunos de los cambios no necesariamente están en la región de la Glicoproteína E2, lo cual hace necesario que se realicen análisis de los genomas completos de los aislados (**Roman y Kielian** 2011, **Zhang et al.**, 2011).

5. CONCLUSIONES

- Se realizó la estandarización de la prueba RT-PCR para la amplificación de la glicoproteína E2 del Virus de Encefalitis Equina Venezolana.
- Se amplificó el virus de aislados provenientes de equinos de Veracruz y Tabasco del año 2011 confirmando que se trataba del virus de EEV, obteniéndose un producto de 1369 nucleótidos que fue secuenciado.
- Por medio de análisis filogenéticos y comparando secuencias de otras partes de América se comprobó que el virus aislado pertenece al subtipo IE enzoótico agrupándose en el linaje de las costas del Golfo de México.
- Los análisis filogenéticos sugieren que los aislados son similares a las cepas MX08-56H y 63U16 aisladas en México.
- El estudio indica que la secuencia en aminoácidos es igual en la glicoproteína E2 al menos, a la cepa 63U16 reportada en 1964, de este modo se infiere que este virus ha estado de forma endémica en México por 48 años.
- Los análisis evolutivos muestran que la selección negativa es de las principales fuerzas evolutivas que están actuando sobre este virus, en favor de la preservación de los fenotipos mejor adaptados en zonas endémicas.
- Los datos epidemiológicos obtenidos, sugieren que las cepas IE enzoóticas que circulan en México tiene la capacidad de afectar a equino y humanos en formas severas.

6. SUGERENCIAS PARA FUTUROS TRABAJOS

- De acuerdo a los resultados obtenidos se sugiere, realizar la amplificación de otras regiones genómicas asociadas al aumento de la virulencia en el virus de VEEV trabajando incluso con genoma completo.
- Pudiendo así, explicar la dinámica de las poblaciones virales e identificar variaciones dentro del subtipo IE que se puedan correlacionar con la patogenicidad del virus.
- Es necesario realizar estudios donde se reporte la capacidad replicativa viral a fin de obtener información acerca de los cambios asociados a secuencias que sean factores de riesgo en la expresión de la morbilidad de la enfermedad.
- Determinar el espectro de la población viral (cuasiespecies) del VEEV en México, obteniendo así un espectro de mutantes y poder desenmascarar genotipos que contengan información con respecto a los factores selectivos durante los procesos infecciosos, así como determinar qué cambios pueden provocar el aumento de la patogenicidad y conocer los determinantes para que el subtipo IE pueda causar epizootias.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Aguilar V. P., Estrada F. J., Navarro L. R., Ferro C., Haddow A. D. and Weaver S. C. 2011. Endemic Venezuelan equine encephalitis in the Americas: hidden under the dengue umbrella. *Future Virology*. 6 (6):721–740.
- Anishchenko M., Alekseev V.V., Lipnitskiĭ A.V. 2006. Venezuelan equine encephalitis: state-of-the-art, *Vopr Virusol. Review Russian*, 51(6):10-3.
- Bandelt H. J., Forster P., Sykes B. C., Richards M. B. 1995. Mitochondrial portraits of human populations, *Genetics* (141):743-753.
- Bandelt H. J., Forster P., Röhl A. 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology Evolution* (16):37-48.
- Beck C. E. and Wyckoff R.W.G. 1938. Venezuelan equine encephalomyelitis *Science*. (88):530.
- Boshell J., Ahumada M. 1999. Identificación y comportamiento de mosquitos en un foco enzoótico de encefalitis equina venezolana en el bosque de San Miguel, Cimitarra, Santander, Colombia. *Revista Biomédica*. Vol.19. Complemento 1.
- Brault A., Powers A., Medina G., Wang E., Kang W., Salas R., Siger J. and Weaver S. 2001. Potential sources of the 1995 Venezuelan equine encephalitis subtype IC epidemic. *Journal Virology*. 75(13):5823-32.
- Brault A. C., Powers Ann, M. Powers, and Weaver Scott C. 2002. Vector infection Determinants of Venezuelan Equine Encephalitis Virus Reside within the E2 Envelope Glycoprotein. *Jornal Virology*. 76(12):6387-6392.
- Campero B. D. 2007. Vacunas de encefalitis equina venezolana, Productora Nacional de Biológica Veterinaria. *Rev. Ciencia Veterinaria*. (1):206-218.
- Deardorff R. E., Estrada G. J., Freier E. J., Navarro L. R., Travassos D. A., Tesh B. Robert and Weaver C. Scott. 2011. Candidate vectors and rodent hosts of Venezuelan equine encephalitis virus, Chiapas, 2006–2007. *Am J Trop Med Hyg* 85(6):1146-1153.

- Ferro C. and Boshell J. 1997. Determinación de la fauna de mosquitos en un foco enzoótico de Encefalitis Equina Venezolana en el Magdalena Medio, Santander, Colombia. *Rev. Biomédica.* (17): 87.
- Forster P., Torroni A., Renfrew C., Röhl A. 2001. Phylogenetic star contraction applied to Asian and Papuan mtDNA evolution. *Molecular Biology Evolution.* (18):1864-1881.
- Garmashova N., Atasheva S., Kang W., Weaver S. C., Frolova E., Frolov I. 2007. Analyses of Venezuelan equine encephalitis virus capsid protein function in the inhibition of cellular transcription. *Journal Virology.* (81):13552-13565.
- Gámez S. S. 2005. Patología neurológica por virus toscana en la provincia de Granada, Tesis Doctoral. pp. 10-82.
- Greene P. I., Paessler S. and Austgen L., Anishchenko M., Brault A. C., Bowen R. A. and Weaver S. C. 2005. Envelope glycoprotein mutations mediate equine amplification and virulence of epizootic Venezuelan equine encephalitis virus. *Journal Virology.* 79(14):9128–9133.
- Hesse R., Roehrig J. T., Trent D. W. and Dickerman R. W. 1988. Genetic variation of Venezuelan equine encephalitis virus strains of the ID variety in Columbia. *Am. Soc. Trop. Med. Hyg.* (38):195-204.
- Hesse Rico R., Weaver SL, Siger de J., Medina G., Salas R. A. 1995. Emergence of a new epidemic/epizootic Venezuelan equine encephalitis virus in South America. *Proc Nat Acad Sci.* 92(12):5278-5281.
- Holmes E. C. 2006. The evolution of viral emergence, conflict of interest statement. *The National Academy of Sciences of the USA.* 103(13):4803-4804
- Kinney R. M., Tsuchiya R., Sneider and Trent D. W. 1993. Molecular evidence the epizootic venezuelan equine encephalities (VEE) IAB viruses are not evolutionary derivations of enzootic VEE subtype I-E of II viruses. *Journal of Virology.* 74(3):519-523.
- Kosakovsky P., Sergei L. and W. Frost Simon D. 2005. Datamonkey: rapid detection of selective pressure on individual sites of codon alignments. *Bioinformatics applications.* 21(10):2531–2533.
- Kubes V., and Rios F. A. 1939. The causative agent of infections equine encephalomyelitis in Venezuela. *Can J Comp Med.* 3(2):43-44.

- Laguna T. V. y Restrepo H. F. 2000. Encefalitis equina venezolana, proyecto conjunto de la oficina general de epidemiología (OGE) el instituto nacional de salud (INS) del ministerio de salud del Perú.
- Li. J. J. 2010. Boletín Sistema Nacional de Epidemiologia Encefalitis Equina Venezolana. Subdirector de Notificación y Registros Epidemiológicos, Dirección de Información Dirección General de Epidemiología. 24(27):51.
- Librado P. and rozas J. 2009. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25(11):1451-1452.
- Mesa D. F. A., Cárdenas Z. J. A., Villamil J. L. C. 2005. Las encefalitis equinas en la salud pública. 1era edición. pp: 123.
- Morilla G. 2007. Encefalitis Equina Venezolana en México, INIP, S.A.G. pp: 163-194.
- Navarro J. C., Medina G., Vásquez C., Coffey L. L., Wang E., Suárez A. 2005. Post epizootic persistence of Venezuelan equine encephalitis virus, Venezuela. *Emerging Infectious Diseases*. 11(12):1907-1915.
- Nielsen R., and Z. Yang. 1998. Likelihood models for detecting positively selected amino acid sites and applications to the HIV-1 envelope gene. *Genetics*. 148(3): 929-936.
- Reinert J. 2000. New Classification for the Composite Genus *Aedes* (Diptera: Culicidae: *Aedini*), elevation of subgenus *Ochlerotatus* to generic rank, reclassification of the other subgenera, and notes on certain subgenera and species. *Journal of the American Mosquito Control Association*. 16(3):175–188.
- Oletta J. F. y Carvajal C. A. 2010, Situación de encefalitis equinas EEV Y EEE en Venezuela. *Noticia Epidemiológica*. Nº 20. pp: 3-7.
- OIE. 2012. *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*. 7ª ed. pp: 794-799.
- PAHO, OPS. 2010. Alerta Epidemiológica en Encefalitis Transmitidas por Artrópodos.

En

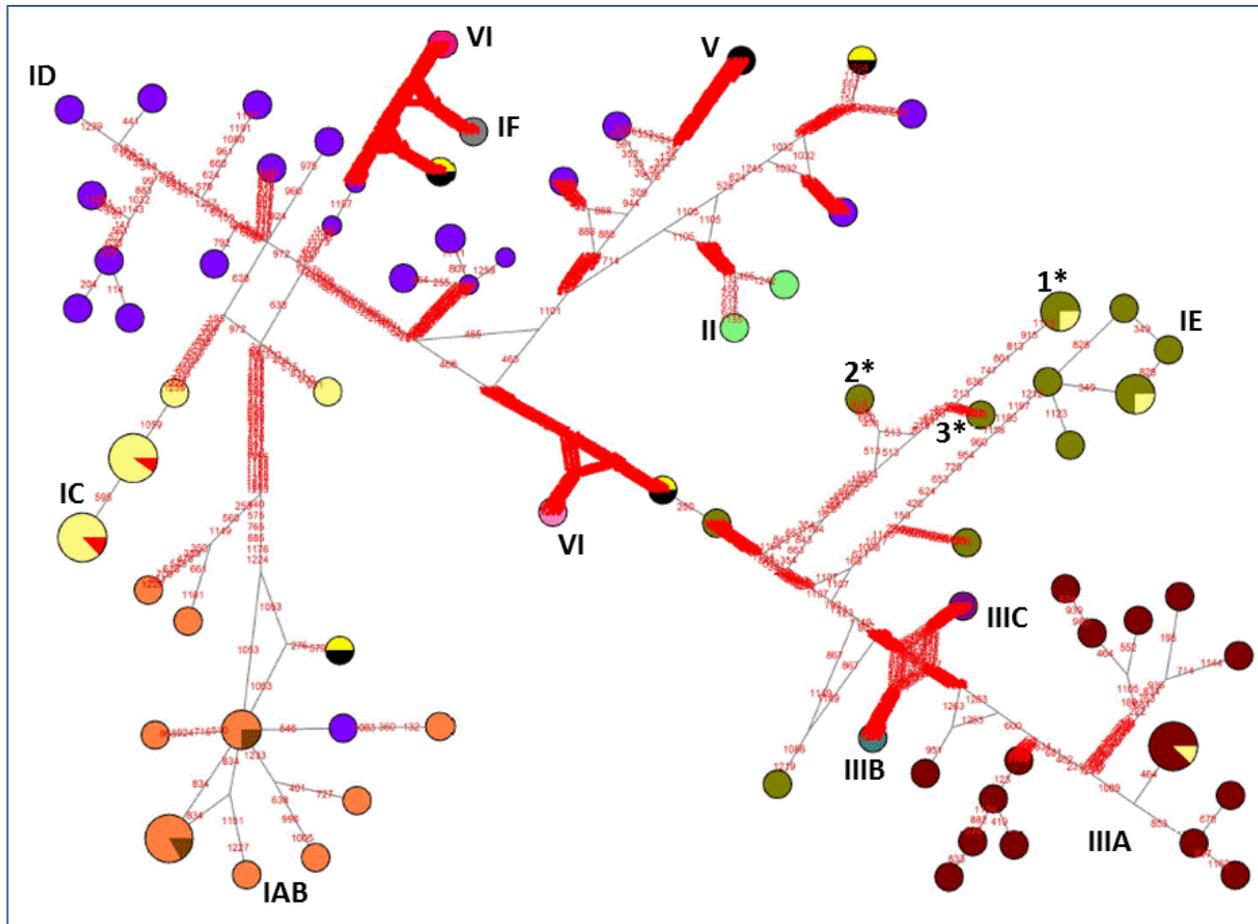
línea:http://new.paho.org/hq/dmdocuments/2010/alertas_epi_2010_20_julio_brote_encefalitis.pdf

- Parker M. D., Buckley M. J., Melanson V. R., Glass P. J., Norwood D. and Hart M. K. 2010. Antibody to the E3 glycoprotein protects mice against lethal 2010 Venezuelan equine encephalitis virus infection. *Journal Virology*. 84(24):12683-12690.
- Pisano M. B., Sánchez S., Ré V. E., Farías A. A., Contigiani S. and Tenorio A. 2011. Specific detection of all members of the Venezuelan equine encephalitis complex: Development of a RT-Nested PCR. *Journal Virology Methods*. 186(1-2):203-6.
- Polzin T., Daneschmand S. V. 2003. On Steiner trees and minimum spanning trees in hypergraphs. *Operations Research Letters*. (31):12-20.
- Powers A. M., Oberste M. S., Brault A. C., Hesse R. R., Schmura S. M., Smith J. F., Kang W., Sweeney W. P., and Weaver S. C. 1997. Repeated emergence of Epidemic/Epizootic Venezuelan equine encephalitis from a single genotype of enzootic subtype ID virus. *Journal of Virology*. 71(9): 6697-705.
- Paessler S., Haolin N., Petrakova O., Fayzulin R. Z., Yun N., Anishechenko M., Weaver S. C., Frolov I. 2006. Replication and clearance of Venezuelan equine Encephalitis Virus from the brains of animals vaccinated with chimeric SIN/VEE viruses, *Journal Virology*. 80(6):2784-2796.
- Posada D. and Crandall K. A. 1998. Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics*. 14 (9):817-818.
- Restrepo H. F. 2000. Encefalitis equina venezolana, *Revista MVZ Córdoba*, 5(001):18-22.
- Rodríguez G. y Boshell J. 1995. Encefalitis equina venezolana. *Biomédica*. 15(3):172-182.
- Roman S. G. and Kielian M. 2011. The interaction of alphavirus E1 protein with exogenous domain III defines stages in virus membrane fusion. *Journal of Virology*. 85(23):12271-12279.
- Sharma A., Bhomia M., Honnold P. S. and Maheshwari K. R. 2011. Role of adhesion molecules and inflammation in Venezuelan equine encephalitis virus infected mouse brain. *Virology Journal*. 8:197.
- Strauss J. H. and Strauss E. G. 1994. The Alphaviruses: gene expression, replication and evolution. *Microbiological Reviews*. 58(3):491-562.

- Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., and Kumar S. 2011. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*. 28(10):2731-2739.
- Thompson J. D., Gibson T. J., Plewniak F., Jeanmougin F. and Higgins D. G. 1997. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*. 25(24):4876-4882.
- Villareal C. C. L. 2007. “Salud animal y salud pública, vínculo para el desarrollo y el bienestar social” contingencias sanitarias el contexto. 15° Reunión anual del CONASA.
- Vargas D. S., Cairo J. C., Vera V. 2009. Aspectos generales de la encefalitis equina venezolana (VEEV) Orinoquia. Universidad de los llanos Colombia. 13(1):59-67.
- Vallina Á. L. 2004. Anticuerpos monoclonales: Realidades y Perspectivas. 1era edición. Editorial Complutense. España pp.172.
- Vilcarromero S., Laguna T. V. A., Fernández C., Gotuzzo E., Suárez L., Céspedes M., Aguilar P. V., and Kochel T. J. 2009. Venezuelan Equine Encephalitis and upper gastrointestinal bleeding in child. *Emerging Infectious Diseases*. 15(2):323-325.
- Wang E., Barrera R., Boshell J., Ferro C., Freier E. J., Navarro J. C., Salas R., Vasquez C. and Weaver S. C. 1998. Genetic and phenotypic changes accompanying the emergence of epizootic subtype IC Venezuelan Equine Encephalitis viruses from an enzootic subtype ID progenitor. *Journal of Virology*. 73(5):4266–4271.
- Weaver S. C., Hagenbaugh A., Bellew L. A., Gousset L., Mallampalli V., Holland J. J. and Scott T. W. 1994. Evolution of alphaviruses in the eastern equine encephalomyelitis complex. *Journal Virology*. 68(1):158-169.
- Weaver S. C., Hesse R. R. and Scott T. W. 1992. Genetic diversity and slow rates of evolution in New World Alphaviruses. *Curr. Top. Microbiol. Immunol*. 176:99-117.
- Wang E., Paessler S., Aguilar P. V., Carrara A. S., Ni H., Greene I. P. and Weaver S. C. 2006. Reverse transcription-PCR-enzyme-linked immunosorbent assay for rapid detection and differentiation of alphavirus infections. *J. Clin. Microbiol*. 44(11):4000–4008.
- Wang E., Barrera R., Bashell J., Ferro C., Freier J.C., Navarro J.C., Salas R., Vásquez C., and Weaver. 1999. Genetic and phenotypic changes accompanying the emergence of epizootic subtype IC Venezuelan equine encephalitis viruses from an enzootic subtype ID progenitor. *Journal Virology*. (73):4266-4271.

- Walton y Suchman. 2010. Boletín: Situación de Encefalitis Equinas de EEV y EEE, Comisión de Epidemiología RSCMV, RDE, RAEV, OVS., ASM MicrobelLibrary.org
- Zarate M. L. 2006. Arbovirus y Arbovirosis en México, Instituto de Salubridad y Enfermedades Tropicales SSA. México, D.F. pp.157-180.
- Zhang R., Hryc C. F., Cong Y., Liu X., Jakana J., Gorchakov R., Baker M. L., Weaver S. C. and Chiu W. 2011. 4.4Å cryo-EM structure of an enveloped Alphavirus Venezuelan equine encephalitis virus. *The EMBO Journal*. (30):3854–3863.

ANEXO I.- ANALISIS DE REDES DE LA GLICOPROTEINA E2 UTILIZANDO TODOS LOS SUBTIPOS



- 1* Muestras aisladas en este estudio
- 2* Cepa aislada en 1963
- 3* Cepa aislada en 2008

Se muestran las mutaciones y las posibles rutas evolutivas que existen entre los diferentes subtipos que conforman al complejo del Virus de la Encefalitis Equina Venezolana así como la distancia evolutiva entre algunas secuencias de estos subtipos, donde observamos el número de mutaciones entre estos.