



**FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y
BIOLÓGICAS**
**CARRERA PROFESIONAL DE MEDICINA VETERINARIA
Y ZOOTECNIA**

**“CÉLULAS MADRE ADIPOSAS DE PERROS CON
ENFERMEDAD CLÍNICA DE DISTEMPER ESTÁN INFECTADAS
POR EL MORBILLIVIRUS CANINO”**

Tesis para optar el título profesional de:
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

Presentado por:

Mabel Fabiola Altamirano Samaniego (0000-0002-0934-6601)

Asesor:

Javier Alejandro Enciso Gutiérrez (0000-0002-9167-7329)

Lima – Perú

2022

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

Lima, 26 de febrero del 2022

Los integrantes del Jurado de tesis:

Presidente: Mg. ANTONIO HERRERA ROSALINO
Miembro: Mg. ROSE MARY BARRETO RÍOS
Miembro: M.V. GILBERTO SANTILLAN ALTAMIRANO

Se reúnen para evaluar la tesis titulada:

"CÉLULAS MADRE ADIPOSAS DE PERROS CON ENFERMEDAD CLÍNICA DE DISTEMPER ESTÁN INFECTADAS POR EL *Morbilivirus canino*"

Presentada por la bachiller:

MABEL FABIOLA ALTAMIRANO SAMANIEGO

Para optar el Título Profesional de Médico Veterinario Zootecnista

Asesorada por el: MSc. JAVIER ALEJANDRO ENCISO GUTIÉRREZ

Luego de haber evaluado el informe final de tesis y evaluado el desempeño de la bachiller de la carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia en la sustentación, concluyen de manera unánime (X) por mayoría simple () calificar a:

Tesista: MABEL FABIOLA ALTAMIRANO SAMANIEGO	Nota: diecinueve		
Aprobado ()	Aprobado - Muy buena ()	Aprobado - Sobresaliente (X)	Desaprobado ()

Los miembros del jurado firman en señal de conformidad.



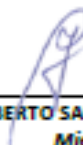
Mg. ANTONIO HERRERA ROSALINO
Presidente



MSc. JAVIER ALEJANDRO ENCISO GUTIÉRREZ
Asesor



Mg. ROSE MARY BARRETO RÍOS
Miembro 1



M.V. GILBERTO SANTILLAN ALTAMIRANO
Miembro 2

DEDICATORIA

A mi esposo, mis hijos y mis tíos César y Mili, por su apoyo constante.

AGRADECIMIENTO

A mi asesor, por sus grandes enseñanzas y cualidades como profesional y persona.

Células madre adiposas de perros con enfermedad clínica de distemper están infectadas por el Morbillivirus canino.

Fabiola Altamirano-Samaniego¹, Javier Enciso-Benavides³, Nancy Rojas⁴, Juan Manuel Iglesias-Pedraz², Nathaly Enciso¹, Matia Fossatti², Javier Enciso^{1,5}

¹ Grupo de Medicina Regenerativa. Universidad Científica del Sur. Lima. Perú

² Laboratorio de Bioquímica y Genética Molecular. Universidad Científica del Sur. Lima. Perú.

³ Laboratorio de Células Madre. Clínica Veterinaria Enciso. Lima. Perú.

⁴ Laboratorio de Microscopía Electrónica. Facultad de Medicina. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima. Perú

⁵ Autor principal: jenciso@cientifica.edu.pe

RESUMEN

La medicina regenerativa en caninos empleando células madre alogénicas exige que dichas células estén libres de agentes infectocontagiosos, siendo el Morbillivirus canino (MC) responsable del distemper canino, uno de los más importantes. Además, la persistencia y latencia viral de este virus son eventos en que aún no se precisan las células de larga vida donde se hospedan estos virus. El objetivo de este trabajo fue determinar si las células madre adiposas (CMA) de caninos con la enfermedad clínica, están infectadas por el Morbillivirus canino. Con este fin se identificaron 12 perros con diagnóstico clínico de la enfermedad del distemper canino en fase nerviosa, luego, mediante RT-PCR se detectó el MC en orina y/o líquido cefalorraquídeo. Posteriormente, a partir de muestras de tejido adiposo del omento menor, en un laboratorio de células madre se aislaron y caracterizaron CMA de los perros infectados. Mediante fluorescencia directa de los cultivos se detectó presencia de antígeno viral, y por citometría de flujo y RT-PCR en 2 cultivos se identificaron cultivos con poblaciones detectables del MC. Por microscopía electrónica de transmisión se confirmó la presencia de partículas del MC dentro de CMA. Los resultados demuestran por primera vez, según nuestro conocimiento, que las CMA de omento de perros con enfermedad de distemper pueden estar infectadas por el MC, postulando su posible participación en la latencia

y/o persistencia de este virus, sugiriendo que debe considerarse su detección en el control de calidad de células madre a ser usadas en medicina regenerativa.

Palabras clave: enfermedad de distemper canino, células madre adiposas, morbillivirus canino, latencia viral, terapia celular

ABSTRACT

This study aimed to determine whether adipose stem cells (ASCs) from dogs with distemper disease are infected with Canine Morbillivirus (CM). Twelve dogs with the neurological phase of the disease and positive for CM by RT-PCR were studied. ASCs from adipose tissue of the lesser omentum of these infected dogs were isolated and characterized. The virus antigen was detected in cell cultures using direct fluorescence, and detectable amounts of the virus were identified in 2 cultures using flow cytometry and RT-PCR. The CM particles within ASCs was confirmed using electron microscopy. Results show that the ASCs of the omentum of dogs with distemper disease can be infected with CM, posing their possible involvement in this virus's latency and persistence, which suggests that its detection should be considered within the quality control process of stem cells intended for regenerative medicine. To our knowledge, this is the first study to demonstrate that omentum ASCs from dogs with distemper disease can be infected with CM and may be involved in viral latency or persistence. These results suggest that the detection of CM should be considered within the quality control process of stem cells intended for regenerative medicine.

Keywords: canine distemper disease, adipose stem cells, canine morbillivurs, viral latency, cell therapy.

INTRODUCCIÓN

La latencia viral es considerada un estado de infección metaestable y no productivo que puede reactivarse posteriormente para repetir el ciclo de infección. Existen numerosas patologías asociadas con las infecciones virales latentes, tales como defectos congénitos, neuropatía, inflamación crónica, disfunciones inmunológicas, enfermedad cardiovascular y cáncer. Existe también una gran complejidad en los mecanismos que controlan el establecimiento, mantenimiento y reactivación de la latencia. Asimismo, estos mecanismos están diversificados entre familias de virus, especies y cepas. La erradicación del virus latente es lo que hoy se ha convertido en un reto importante, aunque esquivo. Requerirá una clara y completa comprensión de los mecanismos que controlan estos procesos [1].

Algunos virus ARN pueden establecer infección persistente dentro del hospedero, lo cual ocasionalmente lleva a una enfermedad reactivada o crónica. Se trata de una estrategia que algunos virus han desarrollado mediante mecanismos específicos que conducen al establecimiento de este tipo de infección en al menos algunos individuos de una población, los que pueden actuar como reservorios del virus [2].

La latencia típicamente ocurre en células que no son permisivas para la expresión genética del ciclo lítico [3], la expresión génica de los genes de latencia requiere microambientes celulares y tisulares que sean excepcionalmente permisivos [4]. La carencia de expresión de antígenos de parte de células infectadas con partículas virales que han entrado en estado de latencia hace que la detección por el sistema inmune sea nula [5]. En muchos casos como el citomegalovirus este estado de latencia hace difícil identificar el tipo de célula huésped [6], ocurriendo lo mismo con otros tipos de virus.

Los modelos de cultivo celular que recapitulan la infección latente proporcionan información valiosa sobre los procesos del huésped que regulan el establecimiento del virus y el mantenimiento de la latencia, como por ejemplo en los herpes virus (HSV1). Usando estos modelos se puede estudiar la latencia en células neuronales primarias de rata tratadas con factor de crecimiento neural (NGF) [7, 8, 9].

Por otro lado, las células madre (CM) son multipotentes y muchas persisten a lo largo de la vida en numerosos tejidos de mamíferos, reemplazando a las células perdidas por renovación homeostática, lesión y enfermedad. Sin embargo, la función de las células madre disminuye con la edad en varios tejidos, incluido el prosencéfalo [10, 11, 12].

En los tejidos de los mamíferos, la mayoría de estas células se mantienen en un estado de quiescencia, dividiéndose intermitentemente para mantener la homeostasis del tejido [13], lo que en algunos casos podría facilitar la latencia o persistencia viral. Esta cualidad de quiescencia de las células madre, las hace candidatas para ser blanco de agentes infecciosos que hacen latencia y/o persistencia, como los virus.

La disminución en la función de las células madre contribuye con la degeneración, la disfunción y envejecimiento de los tejidos regenerativos [14]. En este contexto, podríamos predecir que, si estas células son infectadas por un virus que luego entra en latencia, éste puede acelerar el envejecimiento celular por disfunción celular y dar origen a enfermedades neurodegenerativas.

La medicina veterinaria, en la actualidad, emplea las células madre para tratar diferentes patologías. Es por ello que su rol como células blanco para la determinación de la presencia de virus latente es clave para evitar la transmisión viral.

El Morbillivirus canino (MC) es considerado uno de los agentes infecciosos más letales de los carnívoros [15] y causa la enfermedad del distemper en perros, la cual es una de las más importantes a nivel mundial en esta especie por ser letal y altamente contagiosa [16, 17], además, es un virus que puede causar enfermedad neurológica asociada a latencia y persistencia viral [18, 19], por lo que debemos identificar las células donde persisten posteriormente a la infección.

Sobre el MC se plantea desde hace muchos años que tiene un mecanismo de persistencia viral aún no explicado molecularmente, el cual le permite invadir el sistema nervioso central sin necesidad de liberar grandes cantidades de partículas virales [20]. Asimismo, se ha descrito infección persistente con eliminación de partículas virales hasta 17 meses pos-infección primaria [21]. Por

otro lado, se ha descrito que el virus Zika reduce el crecimiento de organoides a partir de células madre embrionarias produciendo apoptosis de estas células [22]. También se ha demostrado que hay comunicación cruzada entre virus y células madre, mediante los microARNs [23], lo cual puede ser útil para explorar estrategias terapéuticas que lleven al control de infecciones virales, así como para conocer los mecanismos de latencia y reactivación empleando células madre [24].

Tomando como base todo lo que se conoce hasta este momento sobre latencia viral y la biología de las células madre multipotentes, postulamos que estas células podrían ser candidatas como hospederas del MC y el primer paso clave es demostrar que el MC infecta dichas células. En ese sentido, el objetivo de este estudio fue determinar si las células madre adiposas (CMA) del omento menor de perros con enfermedad clínica de distemper pueden estar infectadas por el MC.

MATERIALES Y MÉTODOS

Este trabajo se realizó en los Laboratorios de Cultivo Celular e Inmunología y en el Laboratorio de Biología y Genética Molecular de la Universidad Científica del Sur y en el Laboratorio de Células Madre de la Clínica Veterinaria Enciso, Santiago de Surco, Lima. Para la ejecución de este trabajo se obtuvo la aprobación del protocolo de investigación por parte de la Comisión de Ética de la Universidad Científica del Sur de Lima, Perú, mediante resolución No. 68-CIEI-AB-CIENTIFICA-2019 (código de registro 048-2018-PRE16).

Muestras de estudio

El estudio se realizó con diferentes muestras tales como líquido cefalorraquídeo, orina, sangre, omento menor de 12 perros sin tomar en consideración raza, sexo ni edad; priorizando la casuística requerida para el estudio: diagnóstico clínico de distemper canino (DC) en fase nerviosa y con diagnóstico positivo a antígenos del MC mediante pruebas cromatográficas rápidas realizadas en diferentes clínicas veterinarias. Se excluyeron los perros que recibieron vacuna

previamente. Previamente a la obtención de las diferentes muestras se obtuvo el consentimiento informado de los propietarios de los animales. El estudio fue abordado como un estudio descriptivo, transversal, no probabilístico por conveniencia.

Determinación de infección con Morbillivirus canino

Perros con distemper canino

Una vez seleccionados los perros, en el Laboratorio de la Clínica Veterinaria se corroboró en muestras de líquido cefalorraquídeo (LCR), orina o sangre, mediante inmunofluorescencia empleando el anticuerpo policlonal contra el virus distemper canino (VMRD Inc, USA), y mediante RT-PCR empleando como sondas P1: 5'- ACA GGA TTG TTG CTG AGG ACC TAT - 3' y P2: 5'- CAA GAT AAC CAT GTA CGG TGC - 3' que permiten amplificar un fragmento de ADN de alrededor de 290 pares de bases (pb) del gen de la nucleoproteína del virus distemper canino.

Células madre adiposas infectadas con Morbillivirus canino

Aislamiento de células madre adiposas

Una vez que los especímenes fueron incorporados a este estudio se tomaron muestras de tejido adiposo de omento menor, previa anestesia con xylacina y ketamina (Agrovet Market Perú) en dosis de 0.2 mg/kg vía IM y Tramadol 2 mg/kg por vía IM [25]. Las muestras de tejido adiposo se depositaron de inmediato en medio de cultivo de células DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) (Gibco) + 1% de penicilina / estreptomomicina / anfotericina 1% (Gibco) y se enviaron al laboratorio para aislamiento de CMA; mientras que en criviales se tomaron muestras de líquido cefalorraquídeo (1 mL), orina (3 mL) o sangre (3 mL) que se remitieron de inmediato al Laboratorio para la detección del MC. Previamente, el propietario había dado su consentimiento informado.

Para el aislamiento de las células mesenquimales se siguió el protocolo descrito por Enciso et al. (2019) [26]. En resumen, la muestra se sometió a disgregación mecánica y enzimática, luego se centrifugó y se eliminó el sobrenadante. La fracción de células madre mesenquimales obtenidas se cultivaron en frascos con medio de cultivo y en condiciones de cultivo celular. Cuando el cultivo alcanzó una confluencia de 70%, se realizó un pasaje para lo cual las células se desprendieron y se subcultivaron en otro frasco. Cuando se obtuvo el segundo pasaje las células se criopreservaron a -80°C hasta ser utilizadas.

Además, para confirmar que eran células mesenquimales se realizó la diferenciación en tejido adipogénico, condrogénico y osteogénico según protocolo establecido por Enciso et al. (2020) [27].

Como células de control negativo se emplearon CMA caninas libres del MC que se mantuvieron criocongeladas en el banco de células madre del mismo laboratorio de la Clínica Veterinaria. Como células de control positivo se utilizaron células madre adiposas libres de MC infectadas con la cepa viral atenuada Onderstepoort contenida en una vacuna comercial (“Nobivac® Puppy DP” Pfizer).

Detección del virus

Inmunofluorescencia

Mediante esta técnica se determinó la presencia del virus a nivel celular siguiendo el protocolo de Agallou et al. (2014) [28], cultivando las células de primer pasaje en laminillas cubreobjetos estériles. Luego, las células madre adiposas fueron cosechadas y fijadas en acetona durante 30 minutos a temperatura ambiente, seguido de una incubación con 1:1000 del anticuerpo policlonal contra el MC conjugado con isotiocianato de fluoresceína (CJ-F-CDV-10M. VMRD, Inc. Pullman, WA 99163, USA), a 37°C durante 1 hora, ubicándolas en una cámara húmeda. Se aplicó buffer pH 7,0, dejando en incubación por 10 minutos con DAPI a concentración 1 en 20,000 a temperatura ambiente. Luego,

las muestras fueron lavadas con buffer fosfato salino (PBS) varias veces, seguidamente se añadió la solución de montaje para ser leídas en un microscopio de fluorescencia (Nikon) [28, 29].

Citometría de Flujo

Para corroborar presencia y población de células madre adiposas infectadas con el MC, células del pasaje 2 fueron descongeladas y pasaron por una tinción intracelular siguiendo el protocolo modificado de tinción intracelular de Foster et al. (2007) [30] y Amidzadeh et al. (2014) [31]. En resumen, se lavaron las células con PBS por tres veces centrifugando a 500 g durante 10 minutos cada vez, luego se fijaron las células durante 15 minutos con PBS/PFA 2% a temperatura ambiente. Posteriormente fueron centrifugadas a 500 g por un lapso de 10 minutos y se lavaron con PBS tres veces más. Seguidamente se permeabilizaron las células añadiendo 200 μ L de PBS/Tween 20 al 0.2% durante 30 minutos y se centrifugaron a 500 g durante 10 minutos y se lavaron 3 veces más con PBS, para finalmente incubar las células con anticuerpos contra virus distemper canino (Canine Distemper Virus (CDV) FITC Conjugate. VMRD, Inc. Pullman, WA 99163, USA) durante 30 minutos a 4°C, luego, se lavaron y se realizó la citometría de flujo usando Guava Easy-Cyte™ (Merck/Millipore), los resultados fueron analizados usando FlowJo V10.

RT-PCR

Se determinó la presencia de ARN viral dentro de las células madre aisladas mediante RT-PCR. Para la detección de ARN viral de MC, se aisló ARN utilizando innuPREP Virus DNA/RNA Kit® (Jena, Alemania) luego se siguió el protocolo propuesto por el fabricante. La cuantificación del ARN se realizó mediante el Fluorómetro Qubit (Invitrogen™, USA) siguiendo el protocolo propuesto por el fabricante del producto.

El diagnóstico molecular RT-PCR se realizó mediante el mismo protocolo y sondas propuestas por Frizk et al. 1999 [32]. Para la síntesis de ADNc se utilizó el ARN obtenido y se realizó según los componentes y concentraciones detalladas a continuación (ARN, 1 ng – 2 μ g./rxn; Random primers, 0.5 μ M; dNTP; 500 μ M; H₂O), los cuales fueron llevados al termociclador 65°C por 5 minutos y 4°C durante 1 minuto. Luego se adicionaron los siguientes

componentes en las concentraciones correspondientes (Buffer, 1X; Ribosome inhibitor, 20 U/rxn; OneScript, 200 U/rxn), para ser llevados al termociclador a 94°C por 60 segundos para la desnaturalización inicial, 40 ciclos para las etapas de desnaturalización (94°C, 60 seg), alineación (60°C, 120 seg) y elongación (72°C, 120 seg), y por último, 72°C por 10 minutos para la etapa de extensión final.

En la reacción RT-PCR se utilizaron sondas para amplificar el gen de la nucleoproteína (NP) del virus de distemper canino y corresponden a P1: 5' – ACA GGA TTG CTG AGG ACC TAT - 3' y a P2: 5' – CAA GAT AAC CAT GTA CGG TGC - 3' (producto de 290 pb). Estas sondas permiten amplificar un fragmento de ADN de alrededor de 290 pb del gen de nucleoproteína del virus. El protocolo de PCR consiste en un periodo de desnaturalización de 94°C por 3 minutos, luego sigue un periodo de 35 ciclos, los cuales comprenden un periodo de desnaturalización de 94°C durante 30 segundos, alineación de 59.5°C por 30 segundos y elongación de 72°C durante 30 segundos. Como última etapa, un ciclo final de extensión de 72°C durante 5 minutos.

La electroforesis se efectuó en gel de agarosa al 2%, a 110 de voltaje y se usó el marcador 100bp Plus Opti-DNA Marker®. Luego de la electroforesis, se incubó el gel con bromuro de etidio (0,5 µg/mL) durante 30 minutos. A continuación, se observó en un transiluminador de luz ultravioleta. Finalmente fue fotografiado, como se aprecia en la Figura 6.

Microscopía Electrónica de Transmisión (MET)

El inicio del procedimiento para el análisis por MET consistió en cultivar aquellas células con fenotipo de CMA para MET en medio de cultivo DMEM (Sigma), para luego suplementar con suero fetal bovino 10% y penicilina / estreptomycin 1%. Para este procedimiento los cultivos fueron suspendidos nuevamente y a continuación, mediante centrifugación, concentrados en tubos de microcentrífuga. En estos, se fijaron, se lavaron y luego post fijados utilizando una solución con el siguiente contenido: glutaraldehído al 2,5% en buffer fosfato 0,1 M, pH 7,2, por un lapso de 30 minutos. Posteriormente, con el propósito de retirar el excedente de fijador, se lavaron con buffer fosfato para, a continuación,

post fijarlos en una campana extractora, utilizando OsO₄ al 1% en agua bidestilada durante un periodo de 60 minutos. A continuación, se procedió con la deshidratación. Esto se realizó en una batería de alcohol etílico de grado ascendente, partiendo de 30% y llegando hasta etanol absoluto. La parte final concluyó con dos pasos de acetona. Seguidamente se procedió con la infiltración con la resina epoxi. Los pasos fueron los indicados a continuación: mezcla de acetona y resina Epón – Araldita (1:1), durante una noche completa; Acetona - resina (1:2), durante 2 horas; resina pura, dos cambios durante 2 horas. Los cambios fueron realizados considerando, en todos los casos, la centrifugación de los tubos con tres minutos de anticipación al cumplimiento de los tiempos recomendados para cada uno de los pasos indicados. Asimismo, utilizando una estufa eléctrica a 60°C, se polimerizaron las muestras ya infiltradas.

Como paso siguiente, se tallaron y cortaron los tacos obtenidos, en un ultramicrotomo. empleando cuchillas de vidrio. Posteriormente se hicieron los cortes ultrafinos. Estos se recogieron en rejillas de cobre de 300 mesh, se impregnaron los cortes con acetato de uranilo y citrato de plomo, de acuerdo con las especificaciones de Reynolds (1963) [33]. Los cortes se analizaron y fotografiaron en un microscopio electrónico de transmisión Modelo Tecnai, marca FEI del Laboratorio de Microscopía Electrónica de Transmisión, Servicio de Anatomía Patológica, Instituto Nacional de Salud del Niño, San Borja, Lima.

RESULTADOS

Determinación de infección por Morbillivirus canino

Perros con distemper canino

Mediante RT-PCR e inmunofluorescencia empleando anticuerpo anti CDV (VMRD, USA) se detectó el virus en las muestras de orina y líquido cefalorraquídeo (LCR) de los 12 perros en estudio.

Células madre adiposas infectadas con Morbillivirus canino

Según el protocolo establecido, se obtuvieron 12 aislados de CMA. Estos se mantuvieron en medio de cultivo DMEM – Gibco 31600-026 1L + 1% de penicilina / estreptomicina / anfotericina 1% (Gibco 15240062).

Al microscopio invertido, las células madre de los cultivos fueron adherentes al plástico. Presentaron morfología alargada, comparable con la de fibroblastos, lo cual, fue ratificado por MET (Figura 1). En este trabajo no se observó en cultivos celulares el efecto citopático que ha sido descrito para este virus.

Al diferenciar en los tres linajes de consenso (adipogénico, condrogénico y osteogénico) se demuestra la multipotencialidad de estos aislados. En estos linajes se identifican los tipos celulares según las tinciones correspondientes: adipocitos, tinción Oil Red O; osteoblastos, Alcian Blue; osteócitos, Alizarin red S. De esta manera, se evidencia material mineralizado, siendo estas cualidades establecidas como inherentes a células madre adultas [34]. Luego del análisis de estos aislados de células madre adiposas se confirmó en dos de ellos la presencia del Morbillivirus canino (MC).

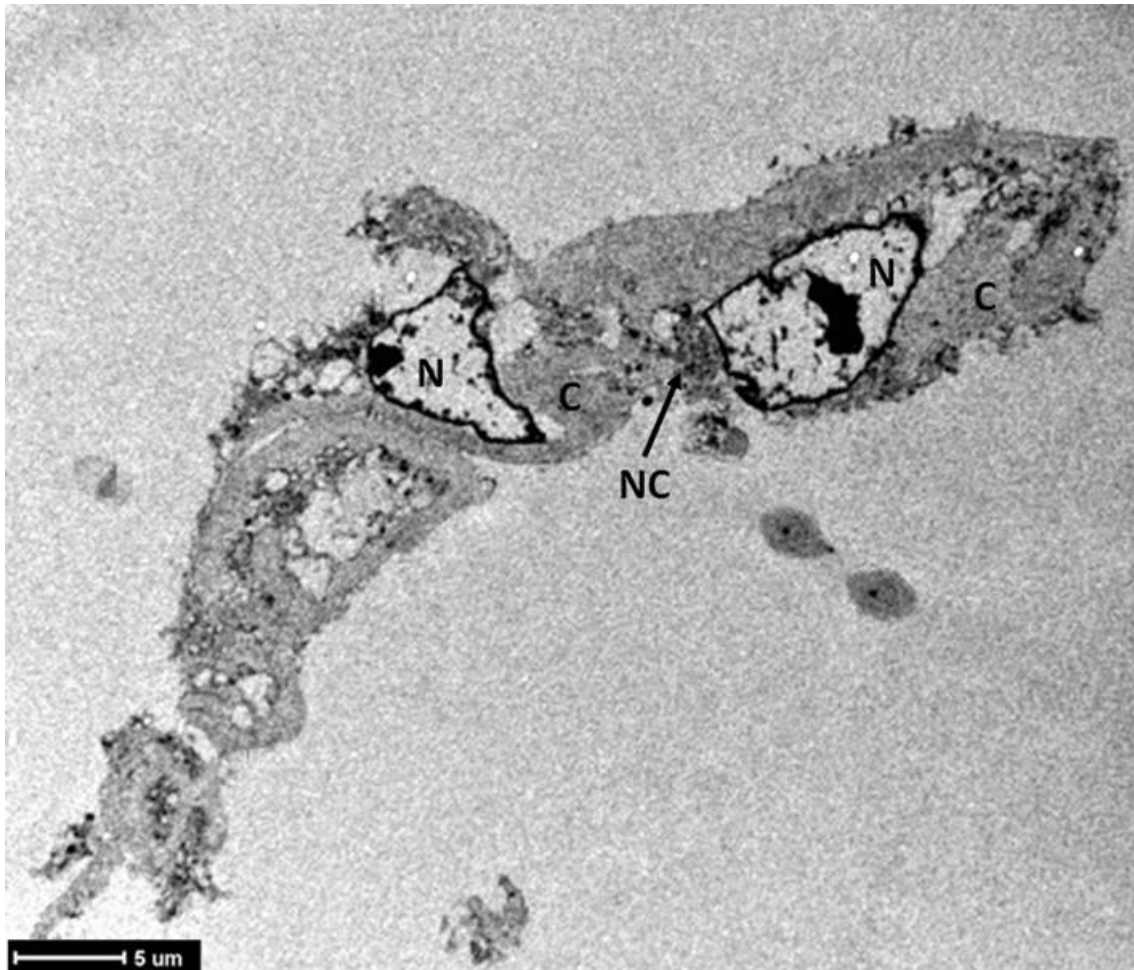


Figura 1. Células madre infectadas con virus de Distemper canino. N: núcleo. C: matriz citoplasmática; NC: nucleocápsides virales intracitoplasmáticas. MET.

Detección del virus

Inmunofluorescencia

Mediante inmunofluorescencia empleando anticuerpo específico para CDV y luego de cultivar por 72 horas las células madre adiposas de pasaje 1 de perros con la enfermedad clínica de distemper, se pudo constatar presencia del CDV en dichas células, (Figura 2.B y Figura 3 A y B), similarmente las células control con CDV vacunal también evidenciaron presencia viral (Figura 2.A). En cambio, las células madre adiposas no infectadas que fueron control negativo no evidenciaron reacción fluorescente.

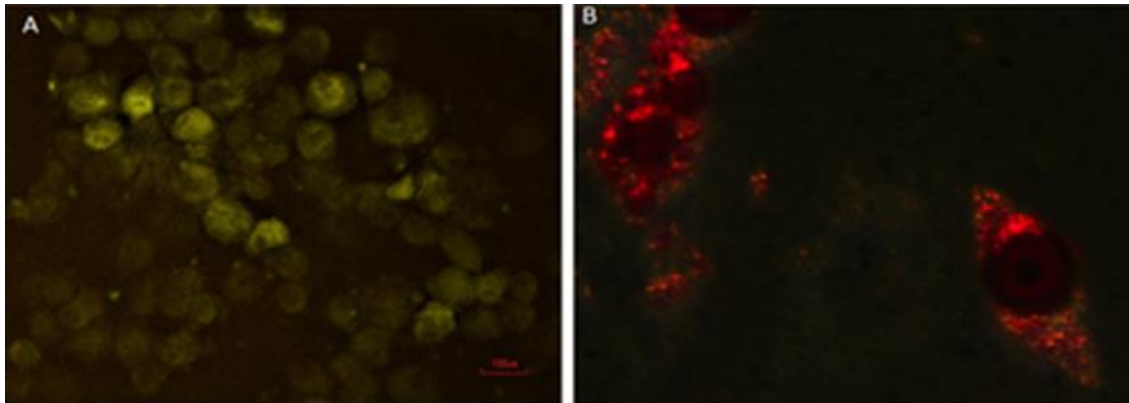


Figura 2. A) Células madre adiposas infectadas con CDV vacunal. 40X. B) Células madre adiposas de perros con infección natural por el CDV. 100X.

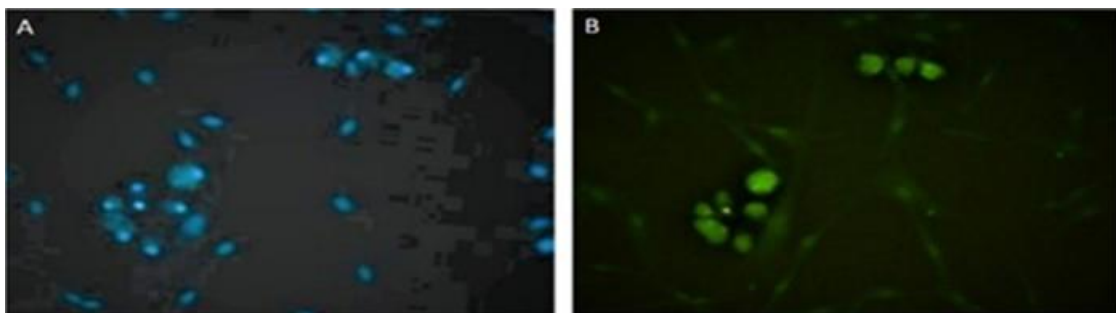


Figura 3. Células madre adiposas. Células de perros con infección natural por Morbillivirus canino. Tinción DAPI (A) e IFD con anticuerpo anti CDV. 40X.

Citometría de Flujo

Se evaluaron 12 aislados del pasaje 2 de células madre adiposas de perros con la enfermedad distemper canino, empleando anticuerpos anti CDV-FITC, y como control negativo se usaron células madre adiposas caninas obtenidas de un perro libre de MC. De los 12 aislados que presentaron diferentes poblaciones de células que van de >2 -8%, las muestras 3 (perra mestiza de aproximadamente 4 meses) y 12 (perra mestiza, cruce con Boxer, de aproximadamente 6 meses) tuvieron mayor porcentaje de células positivas a CDV, mientras que el control negativo correspondiente a un perro sano evidencia <1% (Figura 4 y 5).

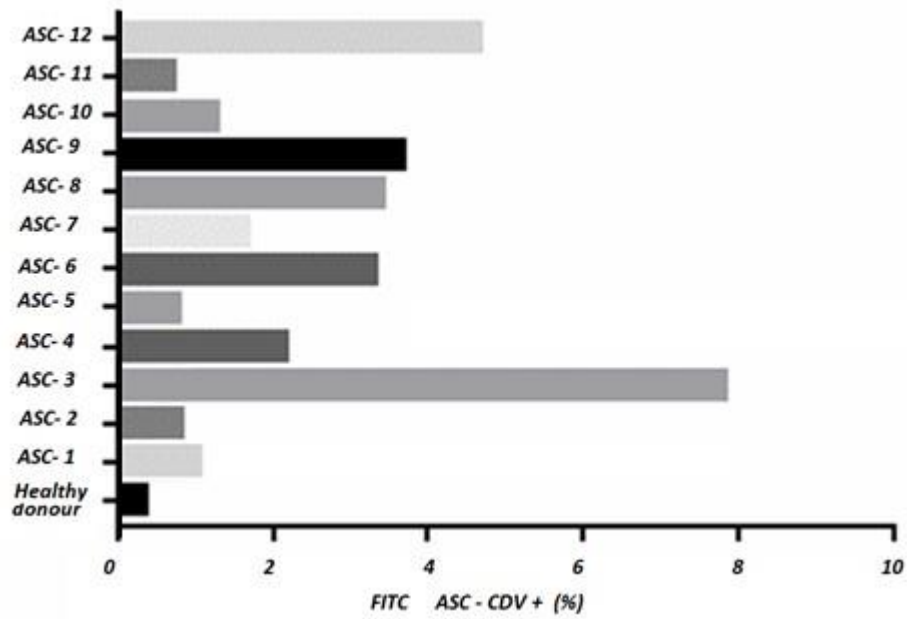


Figura 4. Porcentaje de células madre adiposas positivas al CDV en los aislados de los perros en estudio.

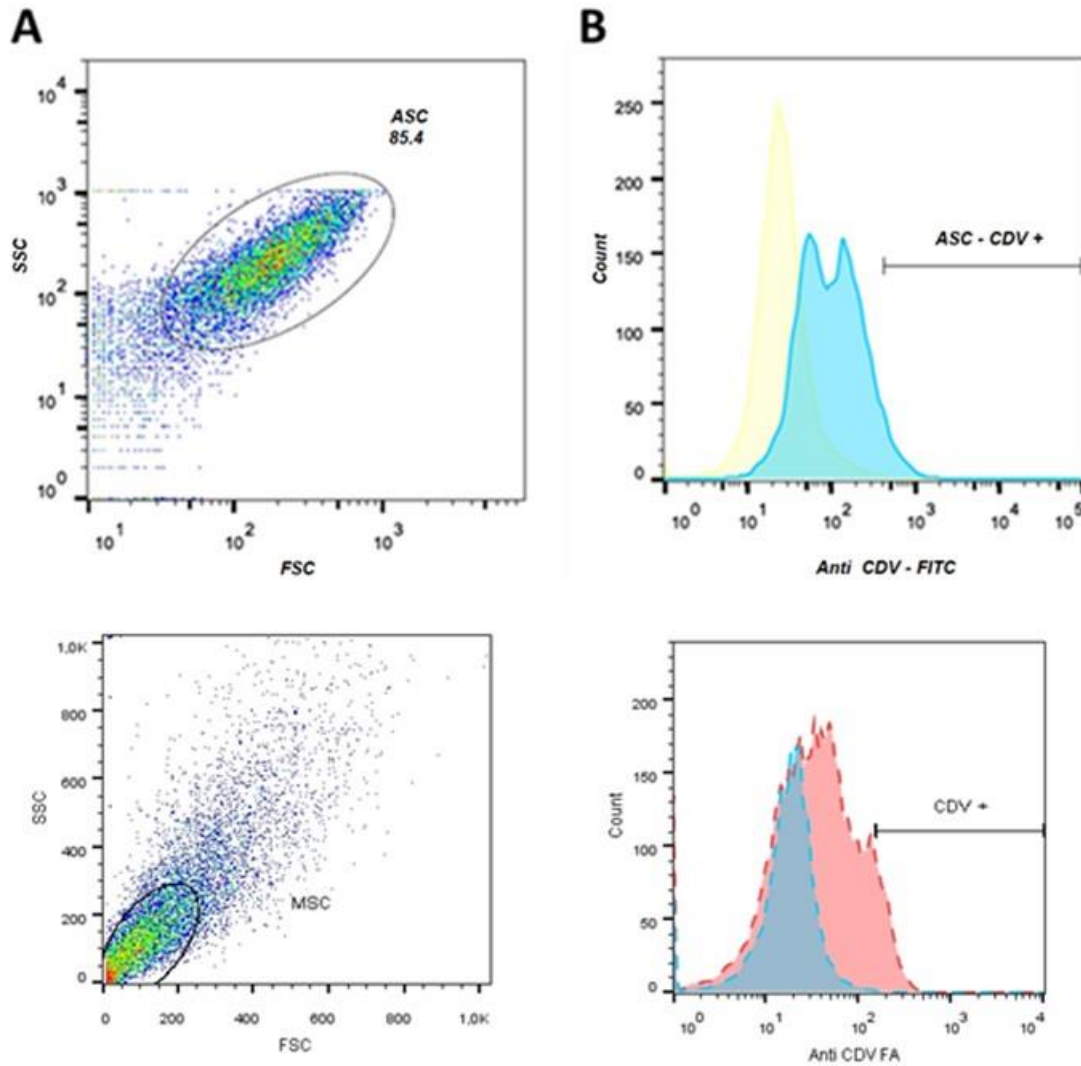


Figura 5. Citometría de flujo. Protocolo de selección, usando un blanco de células madre de individuo sanos (curva azul) frente a células madre de individuos enfermos (curva roja).

RT-PCR

Mediante RT-PCR se buscó el MC siguiendo el protocolo descrito en materiales y métodos de este trabajo, demostrando presencia del virus en 2 muestras (muestras 3 y 12) de células madre adiposas aisladas a partir de perros con la enfermedad de distemper (Figura 6).

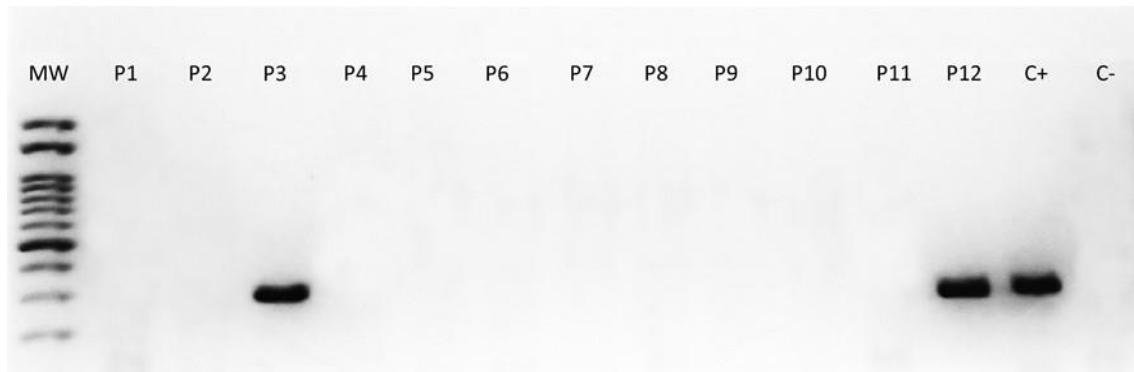


Figura 6. Electroforesis del RT-PCR de células madre adiposas de perros con distemper. P3 y P12 son muestras positivas, tienen bandas similares a C+ que es el control positivo. C- es el control negativo.

Microscopía Electrónica de Transmisión

Mediante MET se constató presencia de viriones en la periferia del citoplasma de células madre adiposas, así como acúmulos de nucleocápsides virales (Figura 7) que fueron obtenidas a partir del omento menor de perros que clínicamente mostraban enfermedad de distemper. Las células infectadas con varias partículas virales en el citoplasma tenían grandes grupos de cuerpos lamelares e inclusiones citoplásmicas con nucleocápsides virales y vacuolización (Figura 8), mientras que a nivel nuclear se observaron núcleos con lisis de matriz nuclear y cromatina marginal (Figura 9).

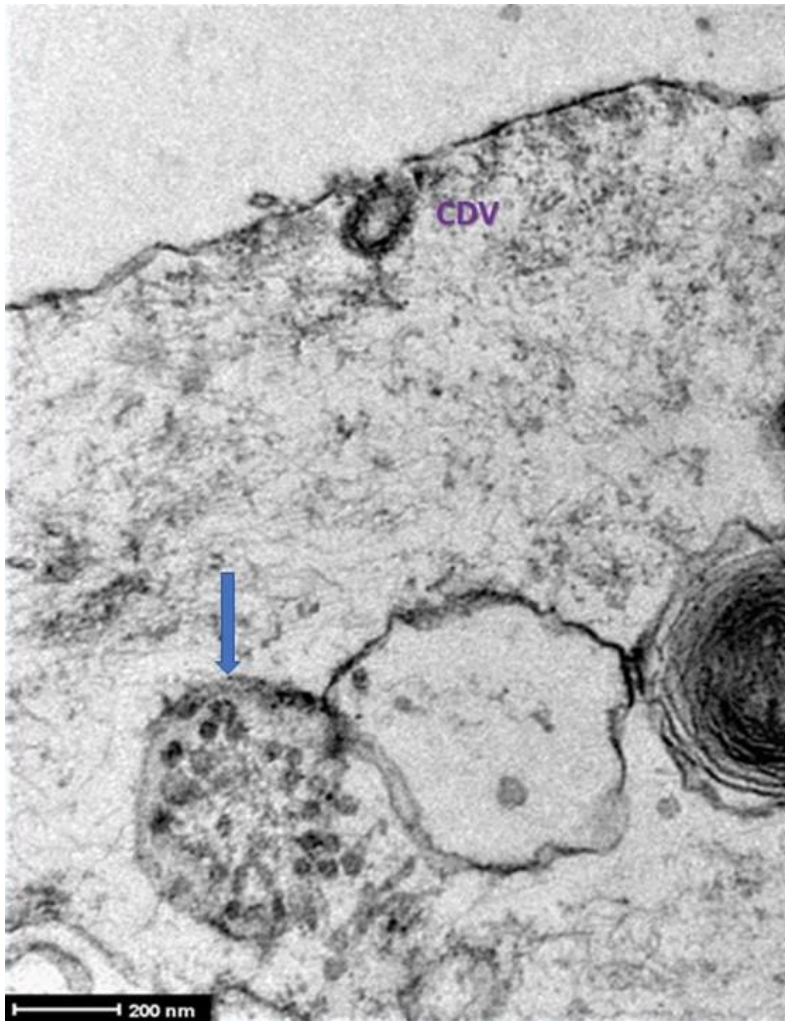


Figura 7. Células madre infectadas con el virus distemper canino (CDV). Nucleocápside intracitoplasmática (flecha). CDV: Virión en la periferia celular. MET.

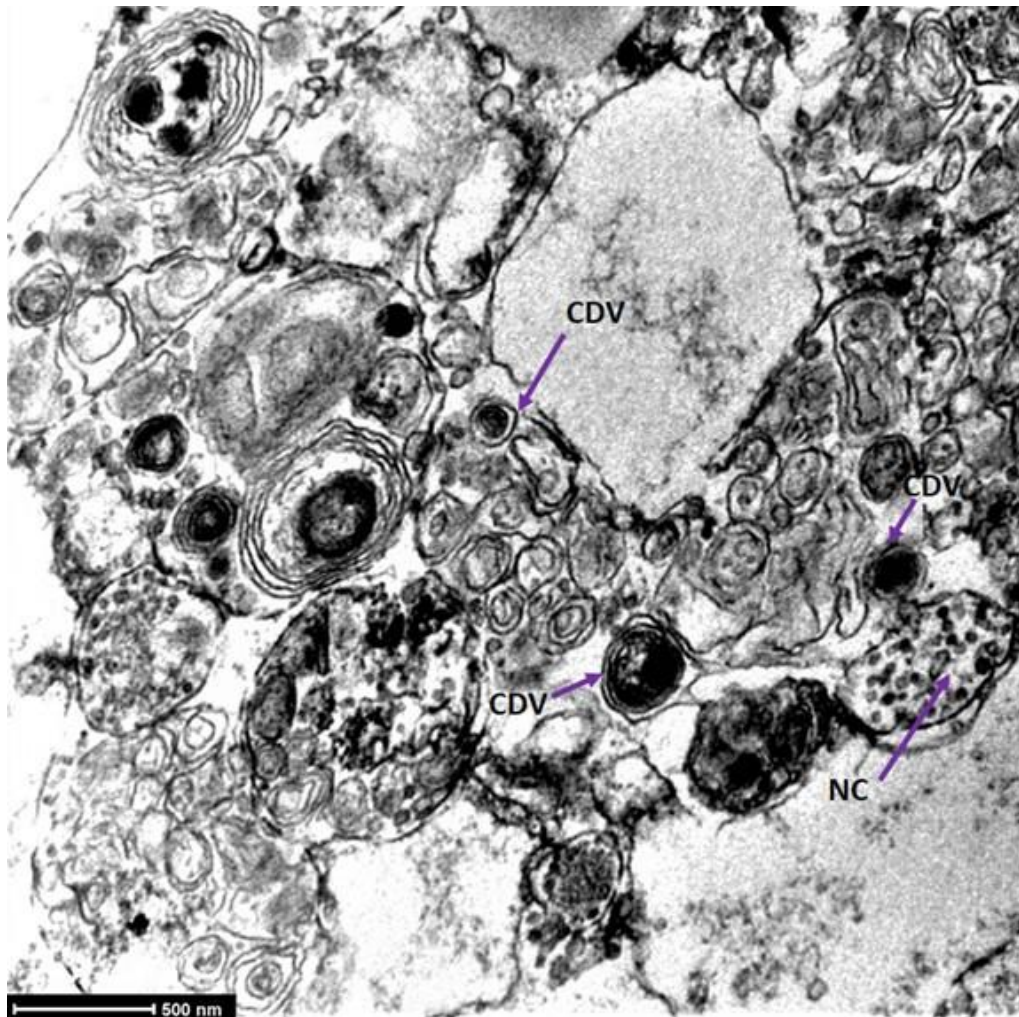


Figura 8. Morbillivirus canino (CDV). Inclusión citoplasmática con nucleocápsides virales (NC). MET.

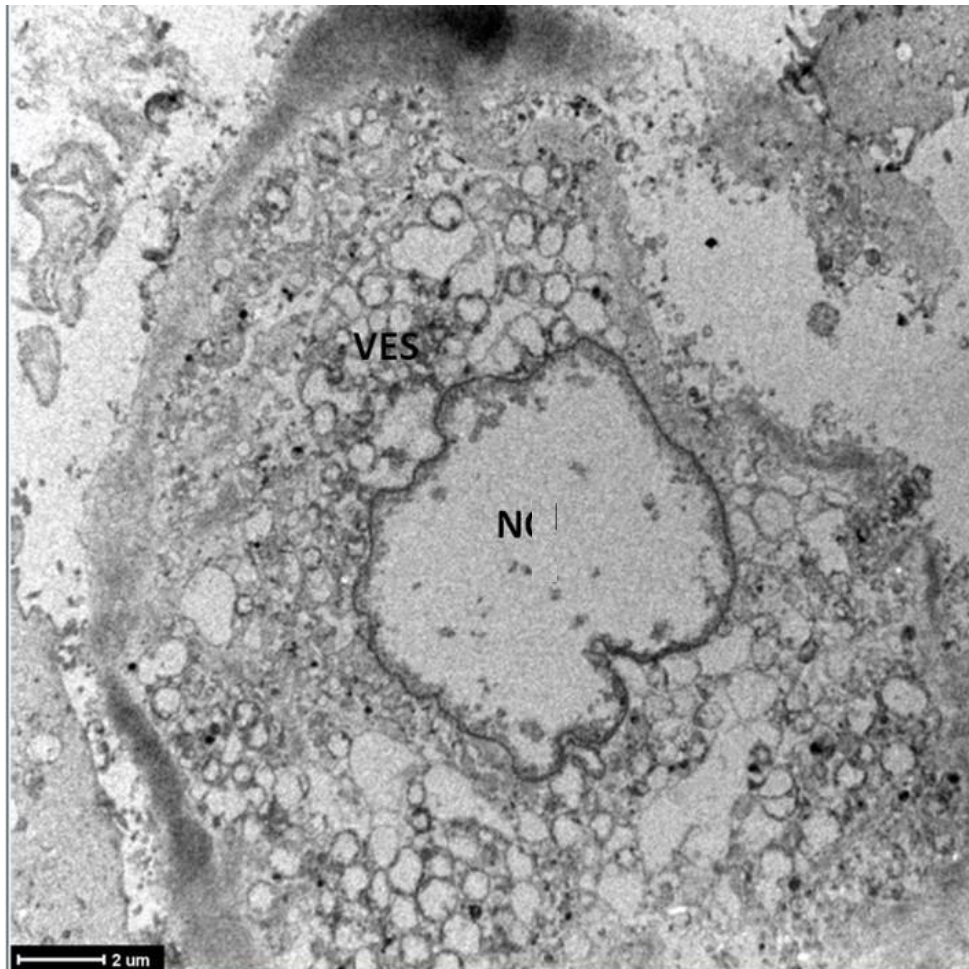


Figura 9. Célula madre infectada con CDV. Núcleo con lisis de matriz nuclear y cromatina marginal. Acúmulos de vesículas de doble membrana en el citoplasma (VES). MET.

DISCUSIÓN

En este trabajo se demuestra por primera vez que el MC, que causa una infección sistémica afectando una amplia gama de órganos y tejidos, infecta también células madre adiposas de perros con enfermedad de distemper con signología nerviosa. Esto se corrobora al evidenciar mediante citometría, partículas virales; por RT-PCR, genes virales; y por MET, partículas virales maduras, en aislados de dichas células. Este hecho demuestra que las células madre adiposas son susceptibles de infectarse por el MC, pero se observa que las células infectadas con el MC no evidenciaron el efecto citopático que se ha descrito en otros trabajos [35], es decir, aquellos cambios que ocurren a nivel celular, inducidos por el virus. A la MET sí se observaron cambios como presencia de viriones en la periferia del citoplasma, acúmulos de nucleocápsides virales, presencia de cuerpos lamelares e inclusiones citoplasmáticas con nucleocápsides virales y vacuolización.

El MC es un virus ARN monocatenario de sentido negativo [36] que infecta múltiples células del perro con predilección por células circulantes, células epiteliales y células nerviosas [37], mientras que las células madre adiposas son inmaduras y no se ha demostrado susceptibilidad a este virus. En ese sentido, los resultados mostrados en este trabajo difieren de lo que propone EZ Poirier y colaboradores recientemente, quienes demuestran que las células madre se protegen de un virus ARN expresando una isoforma de la enzima Dicer denominada aviD, la cual potencia la interferencia antiviral del ARN limitando la infección por virus ARN de las células madre de mamíferos [38].

Por otro lado, en este estudio, mediante citometría de flujo encontramos que de los 12 aislados de CMA en el segundo pasaje, obtenidos a partir del omento menor de perros con la enfermedad de distemper en fase nerviosa, dos aislados tenían partículas virales en alto porcentaje de sus poblaciones, lo cual fue ratificado mediante RT-PCR. Los demás aislados fueron negativos para MC mediante esta técnica, a pesar de que todos los animales de donde procedían las muestras fueron positivos al CDV mediante prueba rápida. Esto se explicaría porque posiblemente la etapa de desarrollo de la enfermedad en los animales de los cuales procedían las muestras negativas aún no involucraba el tejido adiposo.

Estos resultados permiten proponer que los MC dentro de las células madre adiposas podrían encontrarse en una fase de latencia, lo que explicaría la ausencia de efecto citopático debido al silenciamiento de los genes relacionados con la lisis [39]. Esta hipótesis se sustenta en lo descrito para el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) que sostiene que el entorno de bajo oxígeno del ganglio linfático puede suprimir la replicación del VIH y promover latencia [40]. Precisamente, se ha demostrado en ratones que las concentraciones de oxígeno en el tejido adiposo se encuentran en aproximadamente un 3% [41]. También es importante considerar que otro estudio demuestra la participación de las células madre mesenquimales en la reactivación de la latencia del VIH [42].

En conclusión, los resultados de este trabajo demuestran que las células madre adiposas de perros con la enfermedad clínica del distemper canino en fase nerviosa están infectadas por el Morbillivirus canino sin causar efecto citopático evidente en cultivo celular. Esto postularía su participación en la latencia de este virus. En ese sentido, es importante sugerir que las células madre adiposas usadas para terapia regenerativa deben pasar un tamizaje de este virus como parte del control de calidad.

AGRADECIMIENTO

Este trabajo fue financiado parcialmente por la Universidad Científica del Sur mediante el contrato No.048-2018-PRE16.

Agradecemos al centro de diagnóstico por imágenes y laboratorio veterinario, ZooDx, por su valioso aporte para la realización de este proyecto. Asimismo, agradecemos a la Veterinaria Aristocat por facilitar casos de distemper, cuyos propietarios accedieron ceder para fines de investigación.

Se agradece a Luis Alfaro Quillas y Wilfredo Pérez Solorzabal por su apoyo en la recolección de muestras y especímenes animales.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Lieberman, P.M. Epigenetics and Genetics of Viral Latency. *Cell Host Microbe*. 2016, 19, 5, 619-628. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27173930>
2. Randall, R.E.; Griffin, D.E. Within host RNA virus persistence: mechanisms and consequences. *Curr Opin Virol*. 2017, 23, 35-42. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28319790>
3. Poole, E.; Sinclair, J. Sleepless latency of human cytomegalovirus. *Med. Microbiol. Immunol. (Berl)*. 2015, 204, 421-429. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25772624>
4. Dictor, M.; Rambech, E.; Way, D.; Witte, M.; Bendsøe, N. Human herpesvirus 8 (Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus) DNA in Kaposi's sarcoma lesions, AIDS Kaposi's sarcoma cell lines, endothelial Kaposi's sarcoma simulators, and the skin of immunosuppressed patients. *Am. J. Pathol*. 1996, 148, 6, 2009–2016. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1861658/>
5. Romani, B.; Allahbakhshi, E. Underlying mechanisms of HIV-1 latency. *Virus Genes*. 2017, 53, 3, 329-339. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28258391>
6. Zhu, D.; Pan, C.; Sheng, J.; Liang, H.; Bian, Z; Liu, Y.; Trang, P.; Wu, J.; Liu, F.; Zhang, C.Y.; Zen, K. Human cytomegalovirus reprogrammes haematopoietic progenitor cells into immunosuppressive monocytes to achieve latency. *Nat. Microbiol*. 2018, 3, 4, 503-513. doi: 10.1038/s41564-018-0131-9. Epub 2018 Mar 27. PMID: 29588542; PMCID: PMC6537872.
7. Camarena, V.; Kobayashi, M.; Kim, J.Y.; Roehm, P.; Perez, R.; Gardner, J.; Wilson, A.C.; Mohr, I.; Chao, M.V. Nature and duration of growth factor signaling through receptor tyrosine kinases regulates HSV-1 latency in neurons. *Cell Host Microbe* 2010, 8, 320-330. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20951966>
8. Wilcox, C.L.; Smith, R.L. HSV latency in vitro: in situ hybridization methods. *Methods Mol. Med*. 1998, 10, 317-326. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21374238>
9. Thellman, N.K.; Triezenberg, S.J. Herpes Simplex Virus Establishment, Maintenance, and Reactivation: In Vitro Modeling of Latency. *Pathogens* 2017, 6, 28. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28644417>
10. Kuhn, H.G.; Dickinson-Anson, H.; Gage, F.H. Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation. *J.*

- Neurosci., 1996, 16, 2027-2033.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8604047>
11. Maslov, A.Y.; Barone, T.A.; Plunkett, R.J.; Pruitt, S.C. Neural stem cell detection, characterization, and age-related changes in the subventricular zone of mice. *J. Neurosci*, 2004, 24, 1726-1733.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14973255>
12. Molofsky, A.V.; Pardal, R.; Iwashita, T.; Park, I.K.; Clarke, M.F.; Morrison, S.J. Bmi-1 dependence distinguishes neural stem cell self-renewal from progenitor proliferation. *Nature* 2003, 425, 962-967.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14574365>
13. Signer, R.A.; Montecino-Rodriguez, E.; Witte, O.N.; Dorshkind, K. Aging and cancer resistance in lymphoid progenitors are linked processes conferred by p16Ink4a and Arf. *Genes Dev.* 2008, 22, 3115-120.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19056891>
14. Sharpless, N.E.; De Pinho, R.A. How stem cells age and why this makes us grow old. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2007, 8, 703-713.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17717515>
15. Techangamsuwan, S.; Banlunara, W.; Radtanakantikanon, A.; Sommanustweechai, A.; Siriaroonrat, B.; Lombardini, A.D. and Rungsipipat A. Pathologic and Molecular Virologic Characterization of a Canine Distemper Outbreak in Farmed Civets. *Veterinary Pathology* 2015, 52, 4. 724-731. DOI: 10.1177/0300985814551580
16. Beineke, A.; Baumgartner, W.; Wohlsein, P. Cross-species transmission of canine distemper virus-an update. *One Health* 2015, 1, 49–59. doi: 10.1016/j.onehlt.2015.09.002
17. Mourya, D.T.; Yadav, P.D.; Mohandas, S.; Kadiwar, R.F.; Vala, M.K.; Saxena, A.K. et al. Canine distemper virus in Asiatic lions of Gujarat State, India. *Emerg. Infect. Dis.* 2019, 25, 2128–30. doi: 10.3201/eid2511.190120
18. Wyss-Fluehmann, G.; Zurbriggen, A.; Vandeveld, M.; Plattet, P. Canine distemper virus persistence in demyelinating encephalitis by swift intracellular cell-to-cell spread in astrocytes is controlled by the viral attachment protein. *Acta Neuropathol.* 2010. 119, 617–630. DOI 10.1007/s00401-010-0644-7.

19. Di Guardo, G.; Giacomini-Stuffler, R.; Mazzariol, S. Commentary: SLAM-and Nectin-4-independent Noncytolytic spread of canine distemper virus in astrocytes. *Front. Microbiol.* 2016, 7, 2011.
20. Zurbriggen, A., Graber, H. U., Wagner, A., & Vandeveld, M. Canine distemper virus persistence in the nervous system is associated with noncytolytic selective virus spread. *Journal of Virology*, 1995, 69, 3, 1678–1686. <https://doi.org/10.1128/jvi.69.3.1678-1686.1995>
21. Lanszki, Z.; Zana, B.; Zeghib, S.; Jakab, F.; Szabó, N.; Kemenesi, G. Prolonged Infection of Canine Distemper Virus in a Mixed-Breed Dog. *Vet. Sci.* **2021**, 8, 61. <https://doi.org/10.3390/vetsci8040061>
22. Dang, J.; Tiwari, S.K.; Lichinchi, G.; Qin, Y.; Patil, V.S.; Eroshkin, A.M. and Rana, T.M. Zika Virus Depletes Neural Progenitors in Human Cerebral Organoids through Activation of the Innate Immune Receptor TLR3. *Cell Stem Cell*, 2016, 19, 258–265. doi.org/10.1016/j.stem.2016.04.014
23. Afshari, A., Yaghoobi, R., & Rezaei, G. (2021). Inter-regulatory role of microRNAs in interaction between viruses and stem cells. *World Journal of Stem Cells* 2021, 13, 8, 985–1004. <https://doi.org/10.4252/wjsc.v13.i8.985>
24. Baird, N.; Zhu, S.; Pearce, C.M.; Viejo-Borbolla, A. Current In Vitro Models to Study Varicella Zoster Virus Latency and Reactivation. *Viruses* 2019, 26, 11, 2. 103. doi: 10.3390/v11020103.
25. Tranquilli, W.; Thurmon, J.; Grimm, K. Lumb & Jones' Veterinary Anesthesia and Analgesia. Blackwell Publishing, 2007. 4ta edición ISBN: 978-0-7817-5471-2
26. Enciso, N.; Amiel, J.; Pando, J.; Enciso, J. Multidose intramuscular allogeneic adipose stem cells decrease the severity of canine atopic dermatitis: A pilot study. *Veterinary World*, 12, 11, 1747-1754.
27. Enciso, N.; Avedillo, L.; Fermín, M.L.; Fragío, C.; Tejero, C. Cutaneous wound healing: canine allogeneic ASC therapy. *Stem Cell Res Ther.* 2020, 11, 1, 261.
28. Agallou, M.; Athanasiou, E.; Koutsoni, O.; Dotsika, E.; Karagouni, E. Experimental Validation of Multi-Epitope Peptides Including Promising MHC Class I- and II-Restricted Epitopes of Four Known *Leishmania Infantum* Proteins. *Frontiers in Immunology* 2014, 5, 268. DOI: [10.3389/fimmu.2014.00268](https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00268)
29. Wang, C.; Li Z. 2017 Molecular conformation and packing: their critical roles in the emission performance of mechanochromic fluorescence materials.

Mater. Chem. Front. 2017, 1, 2174-2194

<https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2017/qm/c7qm00201g>

30. Foster, B.; Prussin, C.; Liu, F.; Whitmire, J.K.; Whitton, J.L. Detection of intracellular cytokines by flow cytometry. *Curr. Protoc. Immunol.* 2007, Chapter 6: doi:10.1002/0471142735.im0624s78
31. Amidzadeh, Z.; Behbahani, A.B.; Erfani, N.; Sharifzadeh, S.; Ranjbaran, R.; Moezi, L.; Aboualizadeh, F.; Okhovat, M.A.; Alavi, P.; Azarpira, N. Assessment of different permeabilization methods of minimizing damage to the adherent cells for detection of intracellular RNA by flow cytometry. *Avicenna J. Med. Biotechnol.* 2014, 1, 38-46. PMID: 24523954; PMCID: PMC3895578.
32. Frisk, A.L.; König, M.; Moritz, A.; Baumgärtner, W. Detection of canine distemper virus nucleoprotein RNA by reverse transcription-PCR using serum, whole blood, and cerebrospinal fluid from dogs with distemper. *J. Clin. Microbiol.* 1999, 37, 11, 3634-43. doi: 10.1128/JCM.37.11.3634-3643.1999. PMID: 10523566; PMCID: PMC85712.
33. Reynolds, E. S. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J. Cell Biol.* 1963, 17, 208-12.
34. Cardoso MT, Pinheiro AO, Vidane AS, Casals JB, de Oliveira VC, Gonçalves N, et al. Characterization of teratogenic potential and gene expression in canine and feline amniotic membrane-derived stem cells. *Reprod Domest Anim.* 2017;52 Suppl 2:58–64.
35. Sultan, S., Lan, N.T., Ueda, T. et al. Propagation of Asian isolates of canine distemper virus (CDV) in hamster cell lines. *Acta Vet. Scand.* 2009, **51**, 38. <https://doi.org/10.1186/1751-0147-51-38>
36. da Fontoura Budaszewski, R., Streck, A. F., Nunes Weber, M., Maboni Siqueira, F., Muniz Guedes, R. L., & Wageck Canal, C. Influence of vaccine strains on the evolution of canine distemper virus. *Infection, Genetics and Evolution* 2016, 41, 262–269. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2016.04.014>
37. Lempp, C., Spitzbarth, I., Puff, C., Cana, A., Kegler, K., Techangamsuwan, S., Baumgärtner, W., & Seehusen, F. New Aspects of the Pathogenesis of Canine Distemper Leukoencephalitis. *Viruses*, 2014, 6, 7, 2571–2601. <https://doi.org/10.3390/v6072571>
38. Poirier, E.Z., Buc, M.D.; Chakravarty, P.; Carvalho J.; Frederico, B-; Cardoso, A.; Healy, L; Ulferts, R.; Beale, R.; Reis e Sousa, C. An isoform of Dicer protects

- mammalian stem cells against multiple RNA viruses. *Science* 2021, 373, 6551, 231-236. DOI: [10.1126/science.abg2264](https://doi.org/10.1126/science.abg2264).
39. Cliffe, A. R., Garber, D. A., & Knipe, D. M. Transcription of the Herpes Simplex Virus Latency-Associated Transcript Promotes the Formation of Facultative Heterochromatin on Lytic Promoters. *Journal of Virology* 2009, 83, 16, 8182–8190. <https://doi.org/10.1128/jvi.00712-09>
40. Zhuang, X., Pedroza-Pacheco, I., Nawroth, I. et al. Hypoxic microenvironment shapes HIV-1 replication and latency. *Commun. Biol.* 2020, **3**, 376. doi.org/10.1038/s42003-020-1103-1
41. Zhibo, Sun.; Lakshmi, S.; Nair.; Laurencin, C.T. The Paracrine Effect of Adipose-Derived Stem Cells Inhibits IL-1 β induced Inflammation in Chondrogenic Cells through the Wnt/ β -Catenin Signaling Pathway. *Regenerative Engineering and Translational Medicine*, 2018, 4:1, 35-41. [Crossref]
42. Chandra, P.K.; Gerlach, S.L.; Wu, C.; Khurana, N.; Swientoniewski, L.T.; Abdel-Mageed, A.B.; Li, J.; Braun, S.; Mondal, D. Mesenchymal stem cells are attracted to latent HIV-1 infected cells and enable virus reactivation via non-canonical PI3K-NF κ B signaling pathway. *Scientific Reports*, 2018, 8, 14702.

ANEXOS



RESOLUCIÓN DIRECTORAL ACADÉMICA DE CARRERA N° 048-DACMVZ-DAFCVB-U. CIENTÍFICA-2019

Lima, 06 de mayo de 2019

Visto el proyecto de tesis presentado por la Bachiller **ALTAMIRANO SAMANIEGO MABEL FABIOLA**, egresada de la Carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia, se expide la presente Resolución:

CONSIDERANDO:

- ✓ Que, para optar el título profesional de Médico Veterinario Zootecnista en la Carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Científica del Sur, es necesario la realización y sustentación de una tesis.
- ✓ Que, el Reglamento de Tesis pertinente, dispone que el Proyecto de Tesis debe ser presentado a la Carrera de acuerdo al perfil aprobado, el cual debe ser dictaminado por el Comité de Investigación.
- ✓ Que, la Bachiller **ALTAMIRANO SAMANIEGO MABEL FABIOLA**, ha cumplido con presentar su proyecto de tesis titulado "**DETERMINACIÓN DE LA INFECCIÓN DE LAS CÉLULAS MADRE ADIPOSAS DEL OMENTO POR EL VÍRUS DISTEMPER CANINO**", bajo la Asesoría del Mg. Javier Enciso Gutierrez.
- ✓ Que la Comisión de Grados y Títulos de la Carrera ha emitido una evaluación favorable y recomienda la inscripción del proyecto citado.

Estando a lo dispuesto por el Reglamento General de la Universidad Científica del Sur, el Reglamento de Tesis de la Carrera y a las normas vigentes, en uso de las atribuciones conferidas a la Carrera,

SE RESUELVE:

1. **APROBAR** el Proyecto de Tesis para optar el Título Profesional de Médico Veterinario Zootecnista titulado: "**DETERMINACIÓN DE LA INFECCIÓN DE LAS CÉLULAS MADRE ADIPOSAS DEL OMENTO POR EL VÍRUS DISTEMPER CANINO**"
2. Declarar a la Bach. **ALTAMIRANO SAMANIEGO MABEL FABIOLA**, expedita para la realización del Proyecto de Tesis aprobado.
3. Nombrar al Mg. Javier Enciso Gutierrez como Asesor del Proyecto de Tesis que realizará la alumna citada.
4. Disponer la inscripción del proyecto de tesis aprobado en el Registro de Tesis para optar el Título Profesional de la Carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la CIENTÍFICA.

Regístrese, comuníquese y archívese.



.....
Dr. Manuel Rosemberg Barrón
 Director Académico
 Medicina Veterinaria y Zootecnia

COMITÉ INSTITUCIONAL DE ÉTICA EN INVESTIGACIÓN CON ANIMALES Y BIODIVERSIDAD



Constancia N° 68-CIEI-AB-CIENTÍFICA-2019

El presidente del Comité Institucional de Ética en Investigación con Animales y Biodiversidad de la Universidad Científica del Sur (CIEI-AB-CIENTÍFICA) da constancia que el proyecto de investigación, cuyos datos se registran a continuación, ha sido aprobado.

Código de registro: **048-2018-PRE16**
 Título: **Determinación de la infección de las células madre adiposas del omento por el virus distemper canino**
 Investigador(a): **Mabel Fabiola Altamirano Samaniego**

La aprobación del proyecto de investigación implica que el documento presentado a evaluación cumple con los lineamientos de Universidad en materia de investigación y ética, los cuales se sustentan en la normativa internacional vigente.

En tal sentido, esta aprobación carecerá de valor si es que el proyecto de investigación arriba indicado es modificado de cualquier forma. Toda enmienda, añadido, eliminación o eventualidad (eventos adversos, etc.) posterior a la fecha de aprobación debe ser reportado al CIEI-AB-CIENTÍFICA.

La vigencia de la aprobación de este documento es de dieciocho (18) meses (hasta el **24 de diciembre del 2020**), periodo en el que puede desarrollarse el proyecto. Cualquier trámite para su renovación deberá ser enviado antes del término de la vigencia de este documento, debiendo suspenderse todo desarrollo hasta que la renovación sea aprobada.

Villa El Salvador, 25 de junio de 2019



Méd. Vet. Gianmarco Paolo Rojas Moreno
 Presidente
 Comité Institucional de Ética en Investigación
 con Animales y Biodiversidad



De: info@preprints.org <info@preprints.org>

Enviado: viernes, 31 de diciembre de 2021 19:07

Para: Javier Alejandro Enciso Gutierrez <jenciso@cientifica.edu.pe>

Cc: Mabel Altamirano Samaniego <4201011011@cientifica.edu.pe>; javier.enciso.benavides@gmail.com <javier.enciso.benavides@gmail.com>; nrojasm@unmsm.edu.pe <nrojasm@unmsm.edu.pe>; jmiglesi71@gmail.com <jmiglesi71@gmail.com>; Nathaly Enciso Benavides <nenciso@cientifica.edu.pe>; matiafossatti@gmail.com <matiafossatti@gmail.com>; jenciso333@cientifica.edu.pe <jenciso333@cientifica.edu.pe>

Asunto: Preprints ID: preprints-53749 - Preprint Uploaded

Dear Dr. Enciso,

You successfully submitted a paper to Veterinary Sciences, and selected the option to make the preprint of the manuscript available online immediately—in advance of peer review and formal publication in the journal—at Preprints (<http://www.preprints.org>):

Preprints ID: preprints-53749

Type: Article

Title: Adipose stem cells from dogs with distemper disease may be infected with canine Morbillivirus

Authors: Fabiola Altamirano-Samaniego, Javier Enciso-Benavides, Nancy Rojas, Juan Manuel Iglesias-Pedraz, Nathaly Enciso, Matia Fossatti, Javier Enciso

Emails: 4201011011@cientifica.edu.pe, javier.enciso.benavides@gmail.com, nrojasm@unmsm.edu.pe, jmiglesi71@gmail.com, nenciso@cientifica.edu.pe, matiafossatti@gmail.com, jenciso333@cientifica.edu.pe

Submission received: 2021-12-31

Preprints is a not-for-profit platform supported by the open access publisher MDPI and allows for free archiving of scholarly works in advance of publication. The majority of journals worldwide support archival of working papers (preprints) on a public server, in advance of peer review and formal publication. Authors can visit the Sherpa database before uploading to Preprints and check the policy of the journal they intend to publish in. For more details on this, please see the following page: <https://www.preprints.org/announcement/show/6>

Your preprint will go through a quick internal check by our editorial staff and should be available online within the next 24 hours. We encourage authors to submit improved versions after the first version is announced. To upload a new version, you can use "Submit Follow-Up Version" in the "My Articles" dashboard under the user profile.

For more information on the policies and process of Preprints, please visit: https://www.preprints.org/how_it_works

Please contact us immediately at info@preprints.org in case of questions.

Best Regards,

Preprints Editorial Office

Email: info@preprints.org

Article

Adipose stem cells from dogs with distemper disease may be infected with canine Morbillivirus

Fabiola Altamirano-Samaniego¹, Javier Enciso-Benavides², Nancy Rojas³, Juan Manuel Iglesias-Pedraz³, Nathaly Enciso⁴, Matia Fossatti², Javier Enciso^{5,*}

¹ Grupo de Medicina Regenerativa, Universidad Científica del Sur, Lima, Perú

² Laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad Científica del Sur, Lima, Perú.

³ Laboratorio de Células Madre, Clínica Veterinaria Enciso, Lima, Perú.

⁴ Laboratorio de Microscopía Electrónica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú.

*Correspondence: jenciso@cientificadelsur.pe

Abstract: This study aimed to determine whether adipose stem cells (ASCs) from dogs with distemper disease are infected with Canine Morbillivirus (CM). Twelve dogs with the neurological phase of the disease and positive for CM by RT-PCR were studied. ASCs from adipose tissue of the lesser omentum of these infected dogs were isolated and characterized. The virus antigen was detected in cell cultures using direct fluorescence, and detectable amounts of the virus were identified in 2 cultures using flow cytometry and RT-PCR. The CM particles within ASCs was confirmed using electron microscopy. Results show that the ASCs of the omentum of dogs with distemper disease can be infected with CM, posing their possible involvement in this virus's latency and persistence, which suggests that its detection should be considered within the quality control process of stem cells intended for regenerative medicine. To our knowledge, this is the first study to demonstrate that omentum ASCs from dogs with distemper disease can be infected with CM and may be involved in viral latency or persistence. These results suggest that the detection of CM should be considered within the quality control process of stem cells intended for regenerative medicine.

Keywords: canine distemper disease, adipose stem cells, canine morbillivirus, viral latency, cell therapy.

Citation: Lastname, F.; Lastname, F.; Lastname, F. Title. *Vet. Sci.* **2022**, *9*, x. <https://doi.org/10.3390/v9xxxx>

Academic Editor: Firstname Lastname

Received: date
Accepted: date
Published: date

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright © 2022 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Viral latency is a metastable and unproductive state of infection which may be subsequently reactivated in order to repeat the cycle of infection. Latent viral infections are associated with several pathologies, such as cancer, congenital defects, neuropathy,

cardiovascular disease, chronic inflammation, and immune dysfunctions. The mechanisms controlling the initiation, continuation, and reactivation of latency are complex and differ among viral families, species, and strains. Eradication of a latent virus has become a significant, albeit elusive, challenge and requires more in-depth understanding of the mechanisms that control these processes [1].

Some ARN viruses can induce persistent infection in the host, which occasionally leads to reactive or chronic disease. This strategy has been developed by some viruses through specific mechanisms that generate this kind of infection in at least some individuals within a population, which become reservoirs for the virus. Some viruses have developed this strategy by specific mechanisms that generate persistent infection in some individuals within a population who become reservoirs for the virus [2].

Latency usually occurs in cells that do not allow gene expression of the lytic cycle; gene expression of latency genes requires cellular and tissue microenvironments that are exceptionally permissive [4]. Detection by the immune system is null due to the lack of antigen expression in cells infected with viral particles that have entered a latent state [5]. In many cases, such as the cytomegalovirus among other viruses, this latency state hinders the identification of the type of host cell [6].

Cellular culture models that represent latent infection provide valuable information on the processes within the host that regulate the virus's settling establishment of the virus and the continuation of latency, such as seen with herpes virus. These models can be used to study the latency in primary neuronal cells of rats treated with nerve growth factor (NGF) [7, 8, 9].

On the other hand, stem cells are multipotent and many persist in several mammalian tissues along a lifetime, replacing cells lost during homeostatic renewal, injury, and disease. However, age decreases stem cell function in several tissues, including the prosencephalon [10, 11, 12].

Most of these cells remain in a quiescent state, dividing themselves intermittently in order to maintain tissue homeostasis in mammalian tissues [13], which can enable virus latency or persistence in some cases. The quiescence displayed by stem cells makes them prone to infection by agents that undergo latency or persistence, such as viruses.

Decreased stem cell function contributes to the degeneration, dysfunction, and aging of regenerative tissues [14]. In this regard, we might infer that, if these cells were infected by a virus that will later enter a latency state, it could accelerate cellular aging through cellular dysfunction and result in neurodegenerative diseases. In this regard, it can be inferred that infection of these cells by a virus that later enters a latency state could accelerate cellular aging through cellular dysfunction and result in neurodegenerative diseases.

Currently, stem cells are being used to treat several pathologies in veterinary medicine, and therefore, their role as target cells for determining the presence of latent viruses is crucial to prevent viral transmission.

Canine morbillivirus (CM) is one the most lethal infectious agents in carnivores [15]. It causes distemper disease in dogs, which is globally one the most important diseases in

this species due to its lethality and high infectivity [16, 17]. Moreover, since this virus can cause neurological disease associated with viral latency and persistence [18, 19], the cells in which it persists after infection need to be identified.

Based on what is known so far about viral latency and multipotent stem cell biology, we propose that stem cells may be suitable host cells for CM. Therefore, this study aimed to determine whether adipose stem cells (ASCs) from the lesser omentum of dogs with clinical distemper disease may be infected with CM.

2. Materials and Methods

This study was carried out in the Cell Culture and Immunology Laboratories and the Molecular Biology and Genetics Laboratory at the *Universidad Científica del Sur* and at the Stem Cell Laboratory belonging to one of the authors.

Study samples

Different samples were taken from 12 dogs – without considering breed, sex, or age – that were clinically diagnosed with neurological clinical canine distemper (CD) and had positive results for CM antigens using chromatographic tests in different veterinary clinics. Independently of the breed, sex, or age, different samples were taken from 12 dogs clinically diagnosed with neurological clinical canine distemper and had positive results for CM antigens using chromatographic tests in different veterinary clinics. Dogs that had previously been immunized were excluded. Owners were asked to sign an informed consent document allowing sample collection from their pets. A descriptive, cross-sectional study design and convenience non-probability sampling method were used in this study.

Determination of infection by canine morbillivirus

Dogs with canine distemper virus

After selection of the dogs, the presence of CM was determined at the Veterinary Clinic Laboratory by immunofluorescence and RT-PCR of cerebrospinal fluid (CSF), urine, or blood. A polyclonal antibody against canine distemper virus (CDV) (VMRD Inc, USA) was used for the immunofluorescence technique with primers P1: 5'-ACA GGA TTG TTG CTG AGG ACC TAT - 3' and P2: 5'-CAA GAT AAC CAT GTA CCG TGC - 3' for RT-PCR, which allow the amplification of a segment of about 290 base pairs (bp) of the CDV nucleoprotein gene.

Adipose stem cells infected with canine morbillivirus

Adipose stem cell isolation

The dogs were anesthetized using a 0.2 mg/kg i.m. dose of xylazine/ketamine (Agroveter Market, Peru) and a 2 mg/kg i.m. dose of tramadol, and adipose tissue samples were taken from the lesser omentum [20]. The adipose tissue samples were immediately placed in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Gibco) cell culture medium + 1% penicillin/streptomycin/amphotericin 1% (Gibco) and sent to the laboratory for ASCs isolation. CSF, urine, and blood samples were taken and immediately submitted to the laboratory in cryovials (1 mL, 3 mL, and 3 mL, respectively) for CM detection.

The isolation of ASCs was performed following the protocol described by Enciso *et al.* (2019) [21]. In brief, the sample was subjected to mechanical and enzymatic

disaggregation, then it was centrifuged, and the supernatant was discarded. The fraction containing the mesenchymal stem cells obtained was cultured in culture media bottles under cell culture conditions. Once the culture reached 70% confluence, the cells were detached to be passaged and subcultured in a different bottle. When the second passage was obtained, the cells were cryopreserved at -80°C until use.

Moreover, to confirm that the cells were in fact mesenchymal cells, they were differentiated into adipogenic, chondrogenic, and osteogenic tissue according to the protocol of Enciso *et al.* (2020) [22].

CM-free canine ASCs previously cryofrozen in the stem cell bank of the laboratory at the veterinary clinic were used as negative control cells. CM-free ASCs infected with the Onderstepoort attenuated viral strain from a commercial vaccine ("Nobivac® Puppy DP", Pfizer) were used as positive control cells.

Virus detection

Immunofluorescence

This technique was used to determine the presence of the virus at a cellular level, in accordance with the protocol described by Agallou *et al.* (2014) [23], in which cells from the first passage are cultured in sterile coverslips. The ASCs were then recovered and fixed in acetone for 30 minutes at room temperature, and subsequently incubated in a humidity chamber with 1:1000 polyclonal antibody against CM conjugated with fluorescein isothiocyanate (CJ-F-CDV-10M, VMRD, Inc. Pullman, WA 99163, USA) at 37°C for 1 hour. After adding buffer at a pH of 7.0, the ASCs were incubated for 10 more minutes with DAPI at a concentration of 1 in 20,000 at room temperature. The samples were then washed several times using phosphate-buffered saline (PBS), and finally, mounting solution was added to read them under a fluorescence microscope (Nikon) [24, 23].

Flow cytometry

To corroborate both the presence and population of CM-infected ASCs, second-passage cells were frozen and passed through an intracellular dye, following the modified intracellular dye protocol described by Foster *et al.* (2007) [25] and Amidzadeh *et al.* (2014) [26]. In brief, the cells were washed three times with BPS, followed by centrifugation at 500 g for 10 minutes each time. They were then fixed for 15 minutes using PBS/PFA 2% at room temperature and centrifuged again at 500 g for 10 minutes and washed three more times with PBS. Subsequently, 200 μL of PBS/Tween 20 at 0.2% were added to permeate the cells for 30 minutes. Then, they were centrifuged at 500 g for 10 minutes and washed three more times with PBS. Finally, the cells were incubated with antibodies against CDV (Canine Distemper Virus FITC Conjugate, VMRD, Inc. Pullman, WA 99163, USA) for 30 minutes at 4°C and washed. Flow cytometry was performed using the Guava Easy-Cyte™ (Merck/Millipore), and the results were analyzed using FlowJo V10.

RT-PCR

The presence of viral RNA within the isolated stem cells was detected using RT-PCR. To detect CM viral RNA, RNA was isolated using the innuPREP Virus DNA/RNA Kit® (Jena, Germany) following the manufacturer's protocol. RNA quantification was carried out using a Qubit fluorometer (Invitrogen™, USA) following the manufacturer's protocol.

The molecular RT-PCR diagnosis was performed using the same protocol and primers as described by Frizk *et al.* [27]. The RNA obtained was used for cDNA synthesis and the following components and concentrations were used: RNA, 1 ng – 2 µg./rxn; Random primers, 0.5 µM; dNTP; 500 µM; H₂O. These were introduced into a thermocycler at 65°C for 5 minutes and 4°C for 1 minute. Then, the following components were added at their respective concentrations: buffer, 1X; ribosome inhibitor, 20 U/rxn; OneScript, 200 U/rxn. They were placed in the thermocycler at 94°C for 60 seconds for initial denaturing, 40 cycles of the denaturing (94°C, 60 s), annealing (60°C, 120 s) and extending (72°C, 120 s) stages and, finally, 72°C for 10 minutes for the final extension stage.

During the RT-PCR reaction, primers P1: 5' – ACA GGA TTG CTG AGG ACC TAT – 3' and P2: 5' – CAA GAT AAC CAT GTA CCG TGC – 3' were used to amplify the CDV nucleoprotein (NP) gene (290 bp product). These primers allow the amplification of a 290-bp DNA fragment of the nucleoprotein viral gene. The PCR protocol consists of a denaturation period at 94°C for 3 minutes followed by 35 cycles involving a denaturation period at 94°C for 30 seconds, annealing periods at 59.5°C for 30 seconds and extension period at 72°C for 30 seconds. The last stage is a final extension period at 72 °C for 5 minutes.

A 2% agarose gel was used for the electrophoresis, at 110 volts, using the 100 bp Plus Opti-DNA Marker®. After electrophoresis, the gel was stained with ethidium bromide (0.5 µg/mL), incubated for 30 minutes, and subsequently visualized in an ultra-violet transilluminator and photographed.

Transmission electron microscopy

The cells presenting the ASCs phenotype in the transmission electron microscopy (TEM) were cultured in DMEM medium (Sigma) containing 10% fetal bovine serum and 1% penicillin/streptomycin. Cultures were resuspended and concentrated through centrifugation in microcentrifuge tubes, in which they were fixed, washed and post-fixed using a solution containing 2.5 % glutaraldehyde in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.2) for 30 minutes. After removing the excess fixative agent by washing with phosphate buffer, the cells were post-fixed using 1 % OsO₄ in double-distilled water for 1 hour in an extraction chamber. Then, they were dehydrated in alcohol solutions in ascending grades – from 30 % up to absolute ethanol – finishing with two acetone steps. For the epoxy-resin infiltration, they were embedded overnight in a mixture of acetone and Epón-Araldita resin (1:1); in acetone/resin (1:2) for 2 hours and in pure resin for 2 hours (two changes). The tubes were centrifuged for 3 minutes before the recommended resting times for each step were over. The infiltrated samples were polymerized on an electric stove at 60 °C.

The blocks obtained were carved and cut using a glass knife ultramicrotome, and ultrathin sections were collected in 300-mesh copper grids. The sections were impregnated with uranyl acetate and lead citrate in accordance with Reynolds (1963) [28]. These cuts were analyzed and photographed in a TEM (model: Tecnai; brand: FEI) at the Instituto de Salud del Niño de San Borja in Lima, Peru.

3. Results

3.1. Determination of infection by canine morbillivirus

3.1.1. Dogs with canine distemper virus

The virus was detected in the urine and CSF samples of the 12 dogs included in the study using RT-PCR and immunofluorescence with anti-CDV antibody (VMRD, USA).

3.1.2 Adipose stem cells infected with canine morbillivirus

Following the aforementioned protocol, 12 ASC isolates were obtained and kept in 1 L DMEM (Gibco 31600-026) culture medium + 1 % penicillin/streptomycin/amphotericin (Gibco 15240062).

Cultured stem cells were observed using an inverted microscope, showing adhesion to plastic and an elongated morphology, similar to fibroblasts, which was ratified by TEM (Figure 1). The cytopathic effect that has been described in cellular cultures of this virus was not observed in this study.

The multipotentiality of the isolate was shown by differentiation into three consensual lineages: adipogenic, chondrogenic, and osteogenic. Adipocytes were identified using Oil Red O dye; osteoblasts, using Alcian Blue dye; and osteocytes, using Alizarin Red S, which reacts with mineralized material; these attributes have been described as inherent in adult stem cells [29]. After analyzing the ASCs isolates, the presence of CM was confirmed.

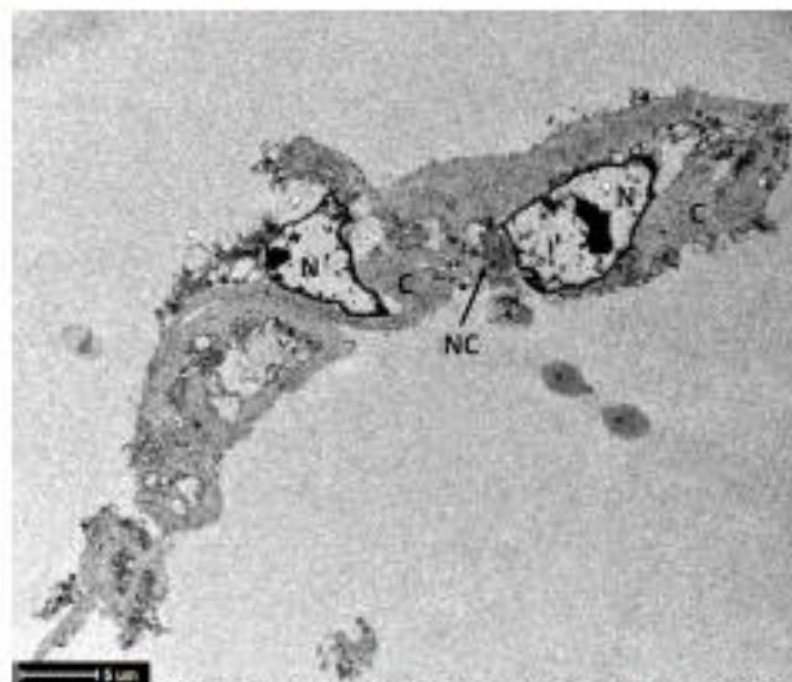


Figure 1. ASC infected with canine distemper virus. N: nucleus; C: cytoplasmic matrix; NC: viral nucleocapsid. TEM.

3.2. Virus detection

3.2.1. Immunofluorescence

The presence of CDV was confirmed by immunofluorescence using a CDV-specific antibody on first-passage ASCs cells from dogs with clinical distemper, after culturing for 72 hours (Figure 2.B and Figure 3 A and B). Positive control cells containing vaccine CDV also showed the presence of the virus (Figure 2.A). In contrast, the uninfected ASCs used as negative controls show no fluorescent reaction.

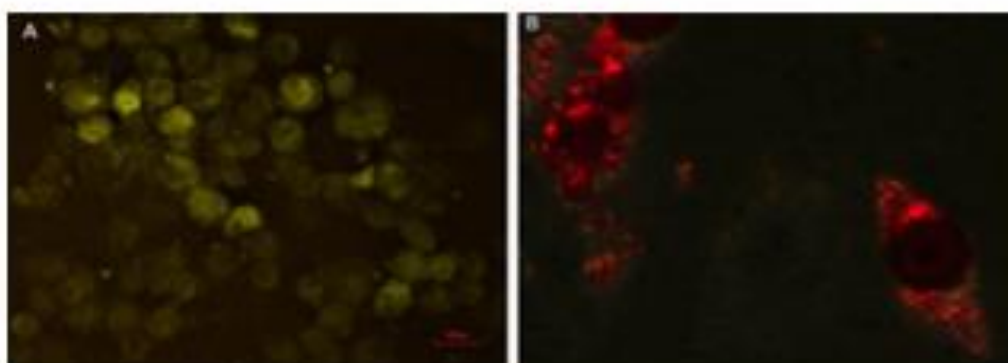


Figure 2. A) ASCs infected with the vaccine canine distemper virus. 40X. B) ASCs from dogs with a natural CDV infection. 100X.

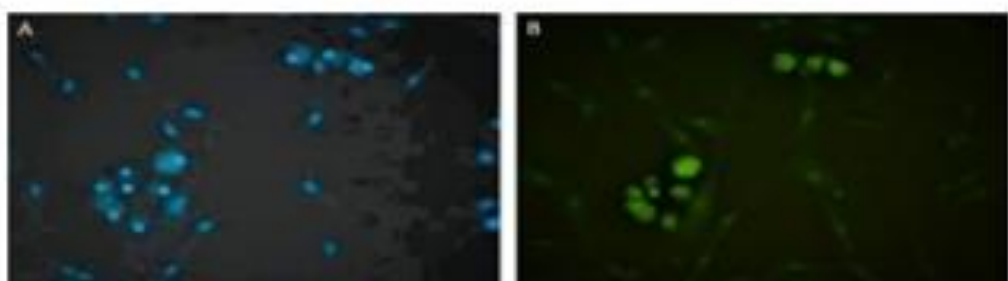


Figure 3. ASCs from dogs naturally infected with canine morbillivirus. DAPI dye (A) and DIF using anti-CDV antibody. 40X.

3.2.2. Flow cytometry

Twelve second-passage ASCs isolates from dogs with clinical canine distemper were analyzed using anti CDV-FITC antibodies. CM-free canine ASCs were used as a negative control. The 12 isolates exhibited different cell populations, ranging from $>2 - 8\%$, with samples 3 and 12 presenting the largest CDV-positive cell population, whereas the negative control from a healthy dog showed $<1\%$ (Figure 4 and Figure 5).

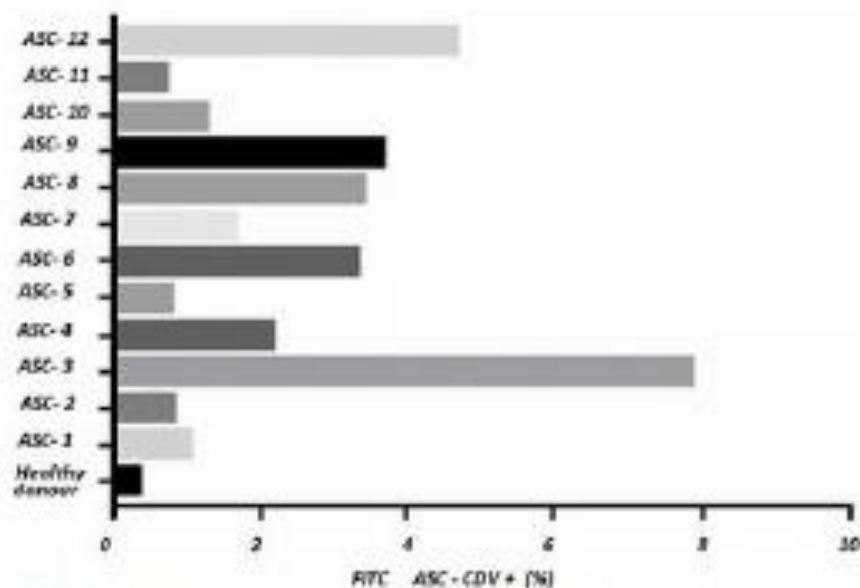


Figure 4. Percentage of CDV-positive adipose stem cells in isolates obtained from the dogs studied.

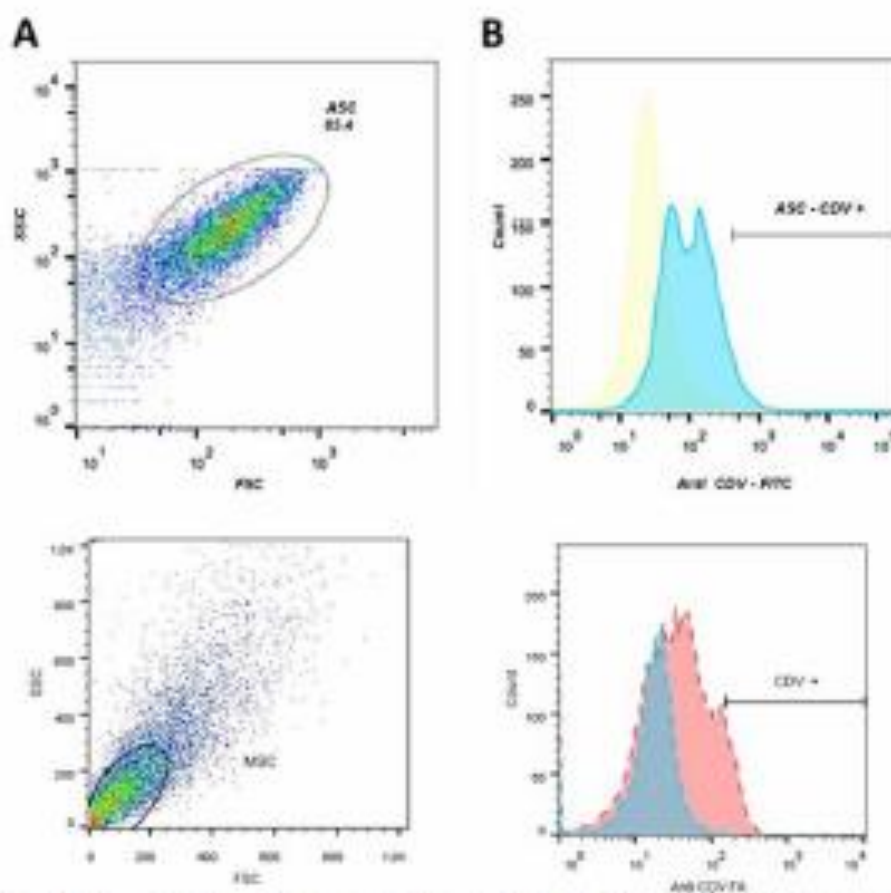


Figure 5. Flow cytometry. Selection protocol using stem cells from healthy subjects as a blank (blue curve) versus stem cells from sick subjects (red curve).

3.2.3. RT-PCR

RT-PCR was used to detect CM, following the protocol described in the Materials and Methods section. The presence of the virus was established in 2 ASC samples (samples 3 and 12) isolated from dogs with distemper disease (Figure 6).

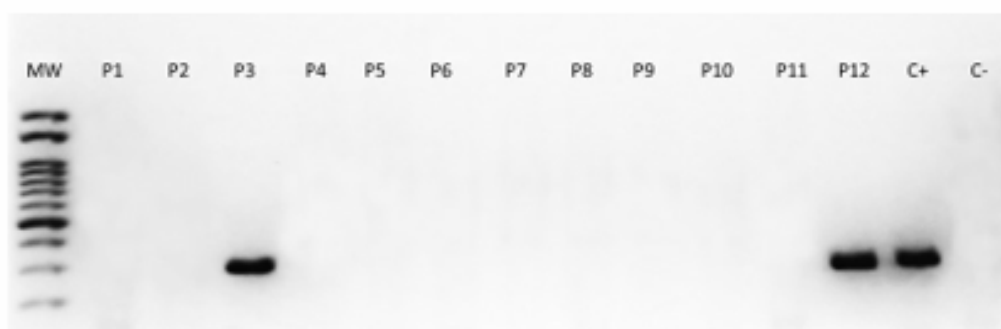


Figure 6. RT-PCR of ASCs from dogs infected with canine distemper virus. P3 and P12: positive samples displaying similar bands as C+. C+: positive control. C-: negative control.

3.2.4. Transmission Electron Microscopy

The use of TEM demonstrated the presence of virions within the peripheral cytoplasm as well as viral nucleocapsid clusters (Figure 7) in ASCs obtained from the ~~meninges~~ of dogs showing clinical signs of distemper disease. The infected cells presenting several viral particles in their cytoplasm had large groups of lamellar bodies and cytoplasmic inclusions with viral nucleocapsids and vacuolization (Figure 8); whereas, at a nuclear level, nucleus with nuclear matrix lysis (CN) and marginal chromatin were observed (Figure 9).

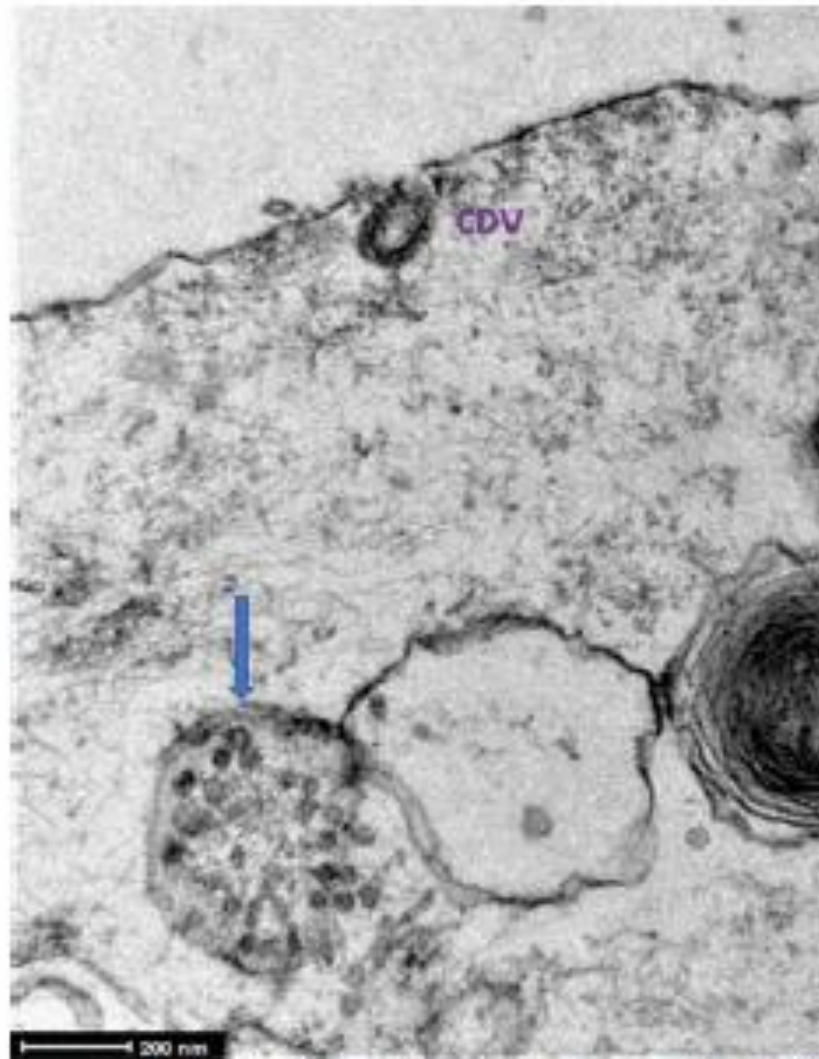


Figure 7. ASC infected with canine distemper virus. Intracytoplasmic nucleocapsid (arrow).
CDV: Virion in the cell periphery. TEM.

274
275
276
277
278

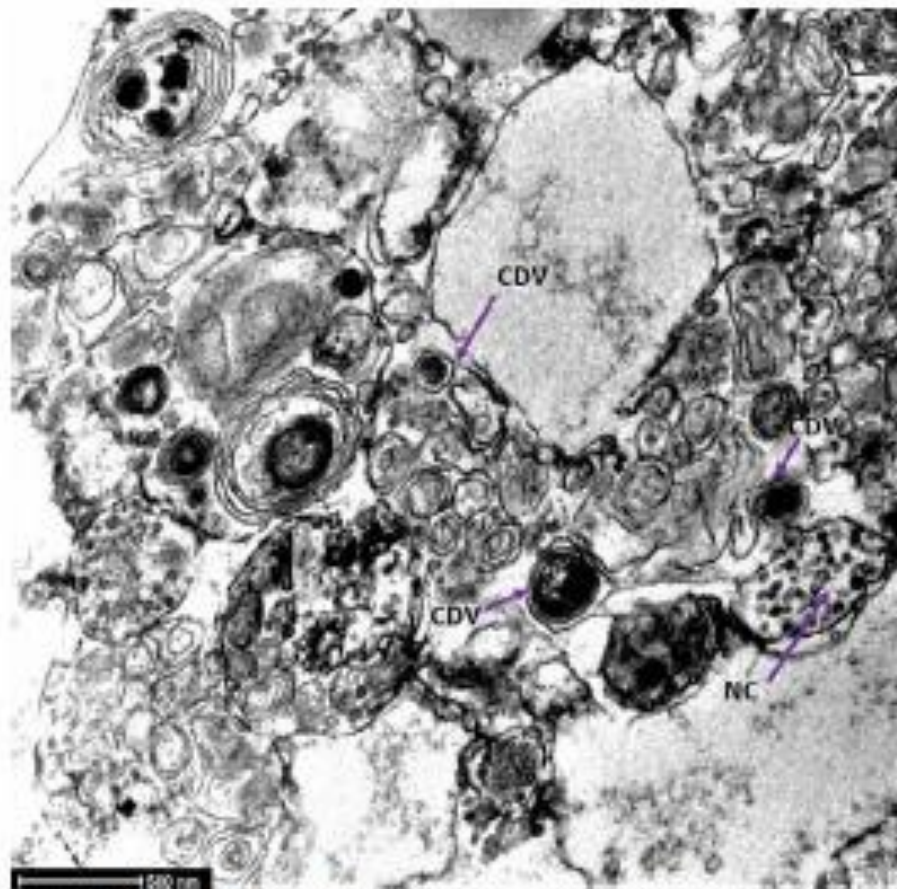


Figure 8. ASC. Canine Morbillivirus (CDV). Cytoplasmic inclusion with viral nucleocapsids (NC). TEM.

279
280
281
282

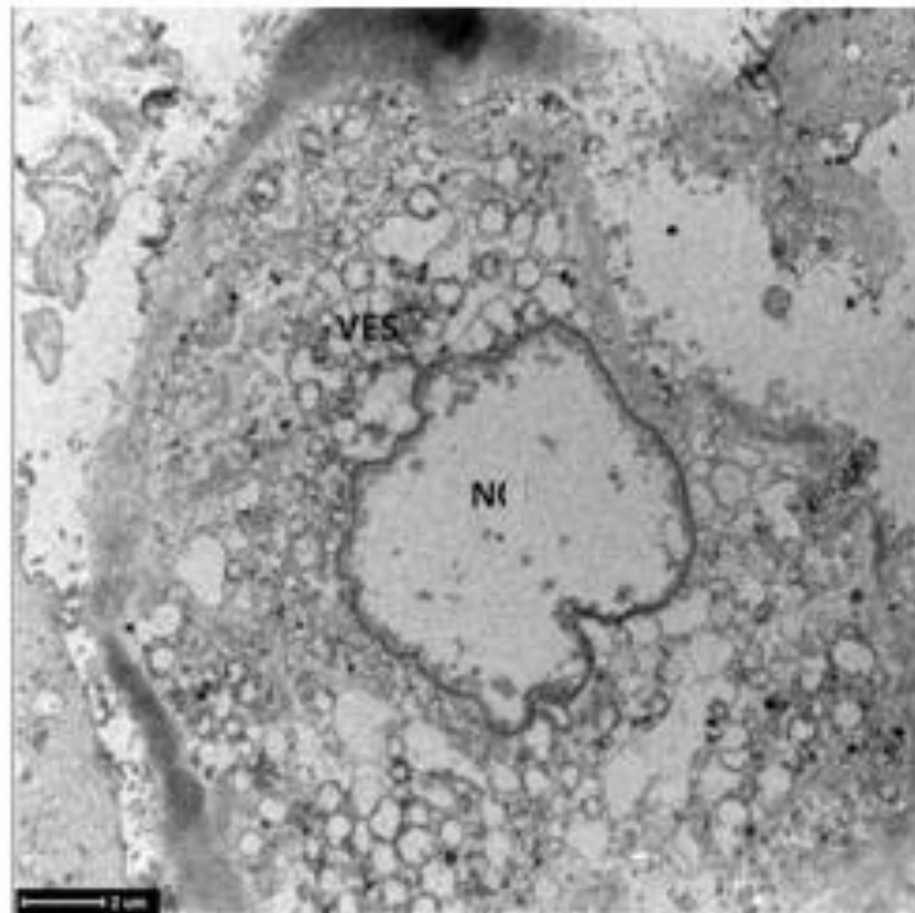


Figure 9. ASC infected with CDV. Nucleus with nuclear matrix lysis and marginal chromatin. Double-membrane vesicle clusters in the cytoplasm (VES). TEM.

4. Discussion

This study demonstrated for the first time that the CM, cause of a systemic infection that affects multiple organs and tissues, infects adipose stem cells in dogs with neurologic distemper disease, by showing evidence of viral particles, using cytometry; viral genes, using RT-PCR; and mature viral particles, using TEM, on these cells' isolates. This is the first study to demonstrate that CM, which can cause system infection affecting multiple organs and tissues, infects ASCs in dogs with neurologic distemper disease. Viral particles were observed in the isolated cells using cytometry, while viral genes were obtained using RT-PCR and mature viral particles were visualized by TEM. This shows that adipose stem cells are susceptible to be infected with CM, highlighting, however, that the cells infected with CM didn't show any evidence of the cytopathic effect that has been described in other studies [30]. These results demonstrate that ASCs are susceptible to infection by CM. It was of note, however, that the cells infected with CM did not show any evidence of the cytopathic effect described in other studies [30]. Nevertheless, changes in their organelles were observed using TEM.

On that regard, although it's not the purpose of the study, we consider that ASCs may have any of the receptors recognized so far for this virus, either the SLAM receptor, found in thymocytes, activated lymphocytes T and B, dendritic cells and macrophages; or the Nectin-4, found in epithelial cells [31, 32, 33]; or a potential third receptor, like the one that may be present in astrocytes which don't display the aforementioned receptors. [34]. While it was not the purpose of the study, we consider that ASCs may have any of the receptors recognized so far for this virus, including the SLAM receptor, found in thymocytes, activated lymphocytes T and B, dendritic cells and macrophages, and Nectin-4 found in epithelial cells [31, 32, 33]. A potential third receptor such as that which may be present in astrocytes not showing the aforementioned receptors may also be present. [34].

The CM is a single-stranded negative-sense RNA virus [35] capable of infecting multiple cells in dogs, with a particular affinity towards circulating cells, epithelial cells, and nerve cells [36]. ASCs, however, are immature and their susceptibility for this virus has not been demonstrated. Therefore, the results of this study differ from what's been recently proposed by other researchers, who have shown that stem cells protect themselves from RNA viruses by expressing an isoform of the Dicer enzyme known as *oviD*, which enhances RNA viral interference, thus limiting the infection of mammalian stem cells by RNA viruses [37]. Therefore, the results of this study contrast to recent proposals by other researchers showing that stem cells protect themselves from RNA viruses by expressing an isoform of the Dicer enzyme known as *oviD*, which enhances RNA viral interference, thereby limiting the infection of mammalian stem cells by RNA viruses [37].

On another note, this study found that 2 of the 12 second-passage isolates obtained from the omentum of dogs suffering from neurological distemper had viral particles in a high percentage of their populations, which was ratified using RT-PCR. On the other side, in our study RT-PCR showed that 2 of the 12 second-passage isolates obtained from the omentum of dogs with neurological distemper had a high percentage of viral particles. The remaining isolates showed negative RT-PCR results for CM, even though all the animals were positive with the CDV rapid test, which may mean that the stage of the disease these animals were in didn't involve the adipose tissue yet, suggesting that the stage of the disease of these animals did not yet involve the adipose tissue.

These results allow us to hypothesize that the CM found within the aASCs may be undergoing a latency phase, which would explain the absence of a cytopathic effect due to the silencing of the lysis-related genes [38]. According to these results we can hypothesize that the CM found within the ASCs may be undergoing a latency phase, which would explain the absence of a cytopathic effect due to the silencing of the lysis-related genes [38]. This hypothesis is based on what has been described for the human immunodeficiency virus (HIV), in which the low-oxygen environment within the lymphatic nodes suppresses HIV replication and promotes latency [39]. Another study demonstrated that adipose tissue in mice has oxygen concentrations of around 3% [40]. In

addition, another study described mesenchymal stem cell involvement in the reactivation of latent HIV [41].

For years, the possibility of a viral persistence mechanism has been proposed for the CMV, which hasn't been molecularly explained but would allow it to evade the central nervous system without needing to release large amounts of viral particles [42]. The presence of a mechanism of viral persistence was proposed years ago. However, although this possible mechanism has yet to be molecularly explained, it would allow evasion of the central nervous system without the need to release large amounts of viral particles [42]. Meanwhile, persistent infection with the release of viral particles up to 17 months post primary infection has been described [43]. On the other hand, the Zika virus, has been described to reduce organoid growth derived from embryonic stem cells, leading to apoptosis of these cells [44]. Moreover, cross communication between viruses and stem cells through miRNAs has been demonstrated [45] and may be useful for exploring therapeutic approaches to control viral infections as well as understanding stem cell latency and reactivation mechanisms [46].

In conclusion, this study shows that the ASCs of dogs with clinical neurological-phase distemper disease are infected with the CMV without presenting an evident cytopathic effect in the cell culture, suggesting their possible involvement in the latency of this virus and that ASCs used for regenerative therapy should undergo screening for this virus as part of their quality control.

Author Contributions: Conceptualization and writing-review and editing, JEG, NE; methodology and investigation NR, FA-S; validation, supervision, formal analysis JE-S; writing-review editing JPI-P, MP. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This study was partly financed by the Universidad Científica del Sur through contract No. 045-2019-PRE1A.

Institutional Review Board Statement: The study research protocol was approved by the Ethics Commission of the Universidad Científica del Sur in accordance with resolution number 05-CIEI-AE-CIENTIFICA-2019 (registration code 045-2019-PRE1A).

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Not applicable.

Acknowledgments: We are thankful to the diagnostic imaging center and veterinary laboratory ScaRe for their valuable contribution during the execution of this project. We also thank the ScaRe local laboratory for providing the distemper cases and the owners who consented to the inclusion of their dogs in this investigation. We thank Luis Alfaro Guillen and Wilfredo Pérez Solonzo for their collaboration in the sample and animal specimen collection.

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

References

1. Lieberman, P.M. Epigenetics and Genetics of Viral Latency. *Cell Host Microbe* **2018**, *19*, 5, 619–628. DOI: [10.1016/j.chom.2018.04.008](https://doi.org/10.1016/j.chom.2018.04.008)
2. Randall, R.E.; Griffin, D.E. Within host RNA virus persistence: mechanisms and consequences. *Curr Opin Virol* **2017**, *23*, 35–42. DOI: [10.1016/j.coviro.2017.03.001](https://doi.org/10.1016/j.coviro.2017.03.001)

3. Foote, E.; Sinclair, J. Sleepless latency of human cytomegalovirus. *Med. Microbiol. Immunol. (Berl.)*. 2015, 204,421-428. DOI: 10.1007/s00430-015-0401-8. 388 397
4. Ditor, M.; Rumbach, E.; Way, D.; White, M.; Bendaba, M. Human herpesvirus 8 (Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus) DNA in Kaposi's sarcoma lesions, AIDS Kaposi's sarcoma cell lines, endothelial Kaposi's sarcoma stimulators, and the skin of immunosuppressed patients. *Am. J. Pathol.* 1996, 145A, 2007-2016. PMID: 869483; PMCID: PMC1851658. 388 398
5. Komari, S.; Allahbakhshi, E. Underlying mechanisms of HIV-1 latency. *Virus Genes*. 2017, 33, 3, 329-339. DOI:10.1007/s11262-017-1483-1. 388 393
6. Zhu, D.; Fan, C.; Shang, J.; Liang, M.; Bao, Z.; Liu, Y.; Tang, F.; Wu, J.; Liu, S.; Zhang, C.Y.; Fan, X. Human cytomegalovirus reprograms haematopoietic progenitor cells into immunosuppressive monocytes to achieve latency. *Nat. Microbiol.* 2015, 3, 4, 503-513. Epub 2015 Mar 27. DOI: 10.1038/nrn1584-018-0131-9. PMID: 25983942; PMCID: PMC4537872. 388 394 395
7. Camarero, V.; Kobayashi, M.; Kim, J.Y.; Boehm, F.; Foster, R.; Gardner, J.; Wilson, A.C.; Mabe, I.; Chao, M.V. Nature and duration of growth factor signaling through receptor tyrosine kinases regulates MSV-1 latency in neurons. *Cell Host Microbe* 2010, 8, 320-330. DOI: 10.1016/j.chom.2010.09.007. 388 393
8. Wilson, C.L.; Smith, R.L. MSV latency in vitro: in situ hybridization methods. *Methods Mol. Med.* 1995, 10, 317-326. DOI: 10.1385/0-89603-347-3-317. 388 400
9. Theilman, N.K.; Trzasko, S.J. Herpes Simplex Virus Establishment, Maintenance, and Reactivation: In Vivo Modeling of Latency. *Pathogens* 2017, 6, 25. DOI: 10.3390/pathogens6030025. 400 403
10. Kuhn, M.G.; Dickinson-Anson, H.; Gage, F.H. Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation. *J. Neurosci.* 1998, 18, 3027-3033. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.18-08-03027.1998. 403 404
11. Maslov, A.Y.; Barone, T.A.; Finkbeiner, S.; Fritschy, J.M. Neural stem cell detection, characterization, and age-related changes in the subventricular zone of mice. *J. Neurosci.* 2004, 24, 1715-1723. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.4608-03.2004. 403 406
12. Molyneux, A.V.; Udels, R.; Ibrahim, T.; Park, I.K.; Clarke, M.F.; Morrison, S.J. Smc-3 dependence distinguishes neural stem cell self-renewal from progenitor proliferation. *Nature* 2005, 435, 861-867. DOI: 10.1038/nature03260. 406 408
13. Signer, R.A.; Montecino-Rodriguez, E.; White, D.M.; Conshkind, K. Aging and cancer resistance in lymphoid progenitors are linked processes conferred by p16INK4 and Arf. *Genes Dev.* 2005, 19, 3115-3120. DOI:10.1101/gad.1719008. 408 410
14. Sharpless, M.E.; DePinho, R.A. How stem cells age and why this makes us grow old. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2007, 8, 705-715. DOI: 10.1038/nrm2241. 410 413
15. Techangamsawan, S.; Santunara, W.; Radtanasakthikanon, A.; Sommarutweschai, A.; Sritanonat, B.; Lombardini, A.D. and Rungtapiwat A. Pathologic and Molecular Virologic Characterization of a Canine Distemper Outbreak in Farmed Ovels. *Veterinary Pathology* 2015, 51, 4, 724-731. DOI: 10.1177/0300985814551530. 413 414 415
16. Betsale, A.; Baumgartner, W.; Wohlsch, F. Cross-species transmission of canine distemper virus-an update. *One Health* 2015, 1, 49-59. DOI: 10.1016/j.onehlt.2015.09.002. 415 417
17. Mourya, D.T.; Yadav, P.D.; Mohandas, S.; Kadivar, R.P.; Vaid, M.K.; Sasana, A.K. et al. Canine distemper virus in Antelopes of Gujarat State, India. *Emerg. Infect. Dis.* 2009, 15, 3115-30. DOI: 10.3201/eid1511.190120. 417 418
18. Wynn-Floresmann, G.; Zurbriggen, A.; Vandewalle, M.; Flahiff, P. Canine distemper virus persistence in demyelinating encephalitis by swift intracellular cell-to-cell spread in astrocytes is controlled by the viral attachment protein. *Acta Neuropathol.* 2010, 119, 817-830. DOI: 10.1007/s00401-010-0844-7. 418 423
19. Di Gaudio, G.; Giacomini-Buffler, R.; Mazzariol, S. Commentary: SLAMF and Nectin-4-independent Noncytolytic spread of canine distemper virus in astrocytes. *Front. Microbiol.* 2016, 7, 2011. DOI: 10.3389/fmicb.2016.02011. 423 424
20. Tranquilli, W.; Thurmon, J.; Grimm, K. *Lumb & Jones' Veterinary Anesthesia and Analgesia*. Blackwell Publishing, 2007. Fourth Edition. ISBN: 978-0-7617-3471-2. 423 425

21. Enciso, M.; Amiel, J.; Pando, J.; Enciso, J. Multidose intramuscular allogeneic adipose stem cells decrease the severity of canine atopic dermatitis: A pilot study. *Veterinary World* 2019, 12, 21, 1747-1754. DOI: 10.14202/veterworld.2019.1747-1754
22. Enciso, M.; Avedillo, L.; Ferrín, M.L.; Frajto, C.; Tejano, C. Cutaneous wound healing: canine allogeneic ASC therapy. *Stem Cell Res. Ther.* 2020, 11, 1, 261. DOI: 10.1186/s13287-020-01775-3
23. Agalou, M.; Athanasiou, E.; Koutsoni, G.; Dotseka, E.; Karagouni, E. Experimental Validation of Multi-Epitope Peptides Including Promising MHC Class I- and II-Restricted Epitopes of Four Known Leishmania Infantum Proteins. *Frontiers in Immunology* 2014, 5, 265. DOI: 10.3389/fimmu.2014.00265
24. Wang, C.; Li Z. 2017 Molecular conformation and packing: their critical roles in the emission performance of mechanochromic fluorescence materials. *Mater. Chem. Front.* 2017, 1, 2174-2194 DOI: 10.1039/C7QM00030G
25. Foster, S.; Frustra, C.; Liu, F.; Whittriss, J.K.; Whitten, J.L. Detection of intracellular cytokines by flow cytometry. *Curr. Protoc. Immunol.* 2007, Chapter 6. DOI:10.1002/0471142735.im0634a78
26. Arzideh, Z.; Behbahani, A.S.; Erfani, M.; Sharifzadeh, S.; Ranjbaran, R.; Moadi, L.; Aboualizadeh, F.; Okhorst, M.A.; Alavi, F.; Asarpina, N. Assessment of different permeabilization methods of minimizing damage to the adherent cells for detection of intracellular RNA by flow cytometry. *Avicenna J. Med. Biotechnol.* 2014, 1, 35-46. PMID: 24523254; PMCID: PMC3885576.
27. Frick, A.L.; König, M.; Möritz, A.; Baumgärtner, W. Detection of canine distemper virus nucleoprotein RNA by reverse transcription-PCR using serum, whole blood, and cerebrospinal fluid from dogs with distemper. *J. Clin. Microbiol.* 1999, 37, 11, 3634-3638. DOI: 10.1128/JCM.37.11.3634-3638.1999. PMID: 10533366; PMCID: PMC95712.
28. Reynolds, E. S. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J. Cell Biol.* 1963, 17, 205-12. DOI: 10.1083/jcb.17.1.205
29. Cardoso MT, Pinheiro AQ, Videna AS, Cassia JS, de Oliveira VC, Gonçalves N, et al. Characterization of teratogenic potential and gene expression in canine and feline amniotic membrane-derived stem cells. *Reprod. Domest. Anim.* 2017, 52 Suppl 2, 58-64. DOI: 10.1111/rda.12832.
30. Baltar, S.; Lan, M.T.; Ueda, T. et al. Propagation of Asian isolates of canine distemper virus (CDV) in hamster cell lines. *Acta Vet. Scand.* 2009, 51, 35. DOI: 10.1186/1751-0147-51-35
31. Cho, N.; Tabuc, H.; Tanaka, K.; Minagawa, H.; Yanagi, Y. V domain of human SLAM (CDw150) is essential for its function as a measles virus receptor. *J. Virol.* 2001, 75, 1994-2000. DOI: 10.1128/JVI.75.4.1994-2000.2001
32. Noyce, R.S.; Delpast, S.; Richardson, C.D. Dog nectin-4 is an epithelial cell receptor for canine distemper virus that facilitates virus entry and syncytia formation. *Virology* 2015, 455, 210-29. DOI: 10.1016/j.virol.2012.11.011
33. Burnell, C.E.; Archer, Ch.; Ahmed, N.; Landolt, J.; Jarosinski, K.W; and Tocio, K.A. Characterization and Comparison of SLAM/CD150 in Free-Ranging Coyotes, Raccoons, and Skunks in Illinois for Elucidation of Canine Distemper Virus Disease. *Pathogens* 2020, 9, 4, 510. DOI: 10.3390/pathogens9040510
34. Alvae, L.; Khoravi, M.; Avila, M.; Adas-Ebert, N.; Bringolf, F.; Zurbriggen, A.; Vandeveld, M.; & Plattet, P. SLAM- and nectin-4-independent noncytolytic spread of canine distemper virus in astrocytes. *Journal of virology* 2015, 89, 10, 5724-5733. DOI: 10.1128/JVI.00004-15
35. da Fontoura Sodaszencki, R.; Streck, A. F.; Nunes Weber, M.; Mibord Siqueira, F.; Murin-Guedes, R. L., & Wajack Canal, C. Influence of vaccine strains on the evolution of canine distemper virus. *Infection, Genetics and Evolution* 2016, 41, 262-269. DOI: 10.1016/j.meegid.2016.04.014
36. Lempp, C.; Spitzbarth, I.; Puff, C.; Cana, A.; Koglar, K.; Techangamawon, S.; Baumgärtner, W., & Seebauer, F. New Aspects of the Pathogenesis of Canine Distemper Leukoencephalitis. *Viruses* 2014, 6, 7, 2573-2601. DOI: 10.3390/v6072573

37. Fottler, E.Z., Buc, M.D.; Chakravarty, P.; Carvalho, J.; Pradotto, S.; Cardoso, A.; Mealy, L.; Ullerts, R.; Sanku, R.; Reis e Sousa, C. An isoform of Bcl-2 protects mammalian stem cells against multiple RNA viruses. *Science* 2021, 375, 6331, 230-234. DOI: 10.1126/science.aba2334.
38. Caffa, A. S., Garbat, D. A., & Knipe, D. M. Transcription of the Herpes Simplex Virus Latency-Associated Transcript Promotes the Formation of Facultative Heterochromatin on Lytic Promoters. *Journal of Virology* 2009, 83, 16, 8153-8160. DOI: 10.1128/jvi.00713-09
39. Zhuang, X., Pedrosa-Pacheco, I., Newnath, L. et al. Hypoxic microenvironment shapes HIV-1 replication and latency. *Commun Biol* 2020, 3, 378. DOI: 10.1038/s42003-020-1105-1
40. Zhebo, Sun.; Lakshmi, S.; Nair; Lorenzin, C.T. The Paracrine Effect of Adipose-Derived Stem Cells Inhibits IL-1 β -Induced Inflammation in Chondrogenic Cells through the Wnt/ β -Catenin Signaling Pathway. *Regenerative Engineering and Translational Medicine* 2015, 4(1), 35-41. DOI: 10.1007/s40883-015-0047-3
41. Chandra, P.K.; Gerlach, S.L.; Wu, C.; Khurana, N.; Swiatkowski, L.T.; Abdel-Mageed, A.S.; Li, J.; Braun, S.; Mondal, D. Mesenchymal stem cells are attracted to latent HIV-1 infected cells and enable virus reactivation via non-canonical PI3K-NF κ B signaling pathway. *Scientific Reports* 2015, 5, 14702. DOI:10.1038/s41598-015-03887-y
42. Zurbriggen, A., Graber, M. U., Wagner, A., & Vandewalle, M. Canine distemper virus persistence in the nervous system is associated with monocytolytic selective virus spread. *Journal of Virology* 1995, 69, 3, 1675-1686. DOI: 10.1128/jvi.69.3.1675-1686.1995
43. Larzidi, Z.; Zana, S.; Zaghib, S.; Jakub, F.; Szabó, M.; Kamenar, G. Prolonged infection of Canine Distemper Virus in a Mixed-Breed Dog. *Vet. Sci.* 2021, 5, 61. DOI: 10.3390/vetsci5040061
44. Dang, J.; Thwari, S.K.; Lichinchi, G.; Qin, Y.; Pahl, V.S.; Enohain, A.M. and Rama, T.M. Zika Virus Depletes Neural Progenitors in Human Cerebral Organoids through Activation of the Innate Immune Receptor TLR3. *Cell Stem Cell*, 2016, 19, 355-365. DOI: 10.1016/j.stem.2016.04.014
45. Afshari, A., Yaghobi, R., & Rezaei, G. (2021). Inter-regulatory role of microRNAs in interaction between viruses and stem cells. *World Journal of Stem Cells* 2021, 13, 5, 985-1004. DOI: 10.4232/wjsc.v13.i5.985
46. Baird, N.; Zhu, S.; Pearce, C.M.; Viejo-Sorbolla, A. Current In Vitro Models to Study Varicella Zoster Virus Latency and Reactivation. *Viruses* 2019, 11, 2, 103. DOI: 10.3390/v11020103.