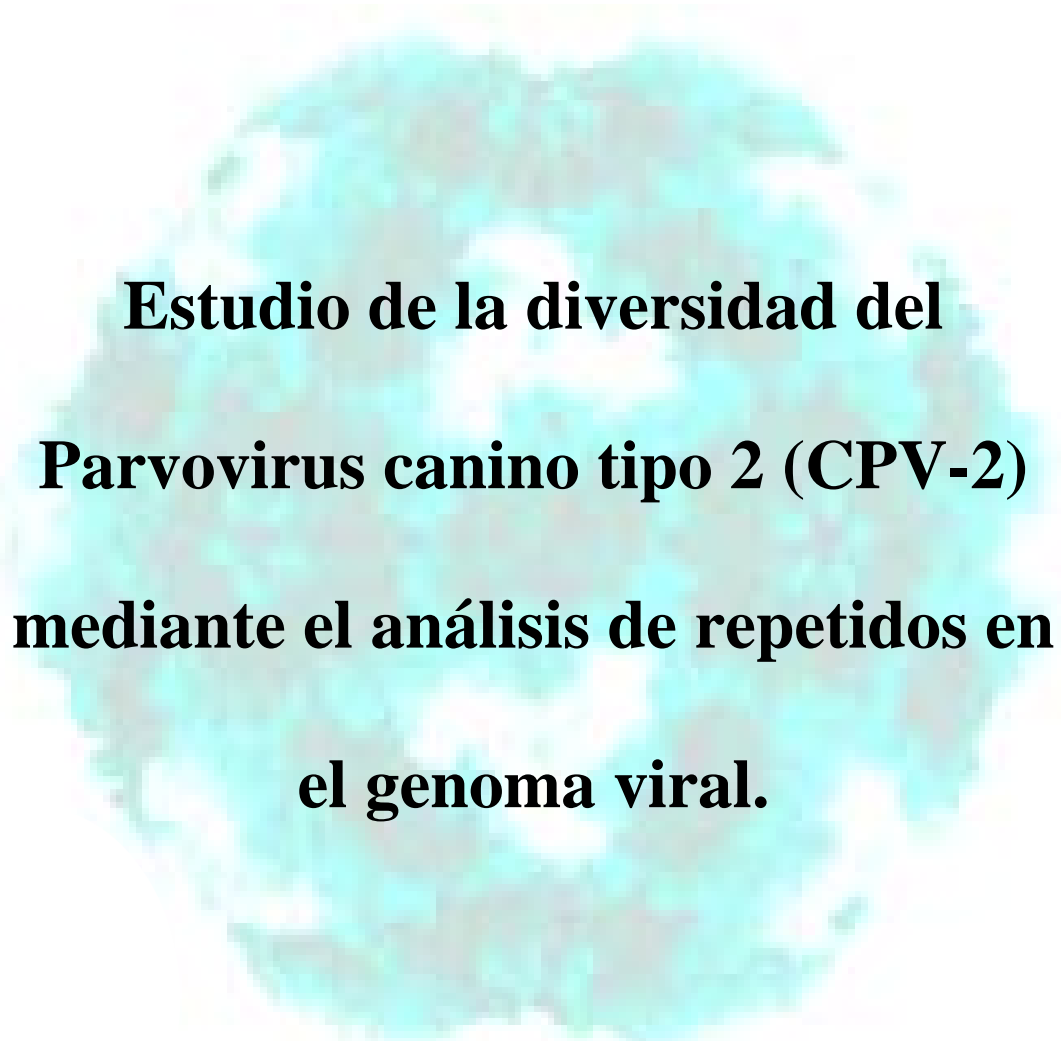




UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
URUGUAY



Facultad de Ciencias
Universidad de la República



**Estudio de la diversidad del
Parvovirus canino tipo 2 (CPV-2)
mediante el análisis de repetidos en
el genoma viral.**

Katia Alejandra Sosa da Silva

Licenciatura en Ciencias Biológicas

Plan 1992

Pasantía de investigación en Biología Molecular

Orientador: Dr. Ruben Pérez

Sección Genética Evolutiva

Facultad de Ciencias

Universidad de la República

Montevideo, mayo de 2009.



<http://genetica.fcien.edu.uy>

Índice

1. RESUMEN	4
2. INTRODUCCIÓN	6
2.1. Familia <i>Parvoviridae</i>	6
2.2. La enfermedad: Parvovirus canina	7
2.3. Diagnóstico	8
2.4. Genoma viral	10
2.5. Proteínas virales	11
2.6. Estructura de la cápside parvoviral	13
2.7. Ciclo replicativo	14
2.8. Origen y evolución	17
3. OBJETIVOS	21
3.1. Objetivo general	21
3.2. Objetivos puntuales	21
4. MATERIALES Y MÉTODOS	22
4.1. Detección y caracterización de las cepas de parvovirus canino presentes en Uruguay	22
4.1.1. Obtención de las muestras	22
4.1.2. Extracción de DNA	23
4.1.3. PCR	23
4.1.4. RFLP	24
4.2. Análisis de la región del segundo grupo de repetidos	25
4.2.1. Diseño de cebadores	25
4.2.2. Cepas de campo	26
4.2.3. Cepas vacunales	26
4.2.4. Extracción de DNA vacunal	26
4.2.5. PCR	27
4.2.6. Clonación	27
4.2.7. Extracción de DNA plasmídico	28
4.2.8. Secuenciación	29
4.2.9. Análisis comparativo de los repetidos	29
5. RESULTADOS	30
5.1. Detección y caracterización del virus en las muestras	30
5.1.1. Detección del virus	30
5.1.2. RFLP	30
5.2. Análisis de la región del segundo grupo de repetidos	30
5.2.1. PCR	30
5.2.2. Clonación	31

5.2.3. Secuenciación	32
5.2.4. Análisis comparativo de los repetidos	32
6. DISCUSIÓN	36
7. CONCLUSIONES	42
8. PERSPECTIVAS FUTURAS	43
9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44
10. ANEXO I: PROTOCOLOS	49
10.1. Clonación con el kit “GeneJet PCR Product Cloning kit” de Fermentas	49
10.2. “Minipreps”, técnica fenol-cloroformo modificada de Sambrook	49
11. AGRADECIMIENTOS	51

1. RESUMEN

El parvovirus canino de tipo 2 (CPV-2) es responsable de la parvovirus, una de las principales enfermedades infecciosas que afecta a perros de corta edad. El CPV-2 es un Parvovirus autónomo, no posee envoltura lipídica y está compuesto de una cápside icosaédrica de 26 nm de diámetro. Su genoma es una monohebra negativa de DNA (5.2 kb) que codifica las proteínas no estructurales NS1 y NS2, involucradas en la replicación viral, y las proteínas estructurales VP1 y VP2 que conforman la cápside.

El CPV-2 emergió y se expandió rápidamente a fines de la década del 70; presuntamente se originó a partir de un parvovirus similar al de la Panleucopenia felina (FPLV) que evolucionó y se adaptó al nuevo hospedero canino. En la década del 80 surgieron consecutivamente dos variantes antigénicas, denominadas CPV-2a y CPV-2b, que reemplazaron al CPV-2 original. En el año 2000 se detectó una nueva variante antigénica llamada CPV-2c, que ha ido aumentando su frecuencia en poblaciones caninas de varias partes del mundo. En el presente trabajo, por medio de la técnica de PCR-RFLP se analizaron 47 fecas de canes uruguayos con síntomas presuntivos de parvovirus, de las cuales 34 resultaron positivas para CPV-2. Todas las muestras positivas fueron genotipadas como CPV-2c, lo que sugiere que dicha variante es la única circulante actualmente en nuestro territorio. Este hecho no había sido descrito en ningún país del mundo e indica que la variante 2c tiene la potencialidad de reemplazar completamente a otras variantes en un corto tiempo.

Los estudios evolutivos demuestran que CPV-2 ha evolucionado por medio de sustituciones nucleotídicas puntuales, especialmente en los genes de las proteínas de cápside. No obstante, analizando secuencias de cepas de CPV-2, hemos detectado también variaciones en secuencias repetidas no codificantes del genoma viral. En la cepa de referencia de CPV-2 (número de acceso M19296 en la base de datos GenBank) se hallan dos grupos de repetidos hacia el extremo 5' del genoma del virus, el primero compuesto por dos monómeros y el segundo por tres. Los monómeros abarcan aproximadamente 60 nucleótidos cada uno pero difieren marcadamente entre el primer y segundo grupo de repetidos. Aunque estas secuencias han sido descritas por varios autores, no se conoce su funcionalidad ni nivel de variación. Nuestro grupo de investigación detectó la existencia de variación en el número de monómeros en el primer grupo de repetidos en las cepas que circulan actualmente por el mundo. Para analizar si una variación similar existe en el segundo grupo de repetidos, en esta pasantía hemos clonado y secuenciado la región correspondiente en cinco muestras uruguayas del parvovirus canino. Se constató que las muestras uruguayas presentan un solo monómero en el segundo grupo de repetidos. Asimismo, mediante estudios comparativos con secuencias

depositadas en las bases de datos genómicas, se determinó que la mayoría de los CPV-2 y otros parvovirus relacionados también presentaban un único monómero con un alto nivel de conservación nucleotídica. En este trabajo sugerimos que la ganancia o pérdida de monómeros en el segundo grupo de repetidos no sigue una tendencia evolutiva (i.e. de cepas antiguas a modernas) sino que constituye un mecanismo extra de variabilidad viral relativamente poco común. Aunque han surgido reordenamientos en el segundo grupo de repetidos parece poco probable la pérdida completa del mismo, ya que la presencia de un monómero en todos los virus analizados y su alta conservación nucleotídica sugieren alguna funcionalidad.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. Familia *Parvoviridae*

El Parvovirus canino tipo 2 (CPV-2), agente etiológico de la parvovirus canina, es un virus perteneciente a la familia *Parvoviridae*. Los integrantes de la misma se encuentran entre los virus DNA animales más pequeños conocidos (“*parvo*”, de latín pequeño). Las partículas parvovirales tienen un peso molecular de $5,5-6,2 \times 10^6$ daltons y un diámetro de 18-26 nm. Su genoma es una molécula de DNA monohebra de aproximadamente 5 Kb, en su mayoría de polaridad negativa. La familia *Parvoviridae* está formada por dos subfamilias: *Parvovirinae*, la cual infecta vertebrados e incluye tres géneros, *Parvovirus* (comprende el CPV-2, el Virus de la Panleucopenia felina (FPLV), el Virus de la enteritis del visón (MEV), el Parvovirus de mapache (RPV), y el Virus diminuto de ratón (MVM)), *Erythrovirus* (incluye al virus humano B19) y *Dependovirus* (engloba los Virus asociados a adenovirus (AAV)); y la subfamilia *Densovirinae*, que infecta insectos y incluye tres géneros, *Densovirus*, *Iteravirus* y *Contravirus* (Fields, 2006).

Los *Dependovirus* son los únicos entre los virus animales que, excepto bajo condiciones especiales, requieren co-infección con un virus colaborador no relacionado, sea un adenovirus o un herpesvirus, para generar una infección productiva (Fields, 2006). Aunque estos virus pueden infectar las células hospederas, su genoma sufre una replicación incompleta. Este genoma defectivo puede integrarse dentro del DNA hospedero en un estado de latencia, pudiendo luego ser activado en una infección posterior con un virus colaborador que inducirá la fase S del ciclo celular y la expresión de los elementos necesarios para la replicación del dependovirus (Chiorini *et al.*, 1996).

Por el contrario, los géneros *Parvovirus* y *Erythrovirus*, clasificados como parvovirus autónomos, no necesitan un virus colaborador para la replicación de su genoma ya que son capaces de replicarse por sí mismos. Sin embargo, al igual que los dependovirus requieren que las células hospederas se encuentren en la fase S del ciclo celular para que se expresen los componentes celulares necesarios para su replicación (Fields, 2006). El hecho de que los parvovirus autónomos solamente repliquen en células en división hace que posean predilección por animales jóvenes, en proceso de gestación, o por tejidos de animales adultos con altos índices de proliferación.

2.2. La enfermedad: Parvovirus canina

La Parvovirus canina emergió en 1978, y en pocos meses se propagó por todo el mundo generando una pandemia que provocó la muerte de decenas de miles de perros (Appel *et al.*, 1979b). Esta patología es una de las enfermedades infecciosas más prevalentes en canes entre 6 y 12 semanas de vida (Desario *et al.*, 2005), pero también puede afectar perros de mayor edad.

La transmisión de la Parvovirus generalmente ocurre de 8 a 12 días postinfección y se realiza vía fecal-oral/nasal (Pollock, 1982). Una vez que el virus entra al organismo, la replicación primaria se produce en las células de la nasofaringe y de la orofaringe, así como en las amígdalas y otros tejidos linfoides. Posteriormente, una fase de viremia disemina el virus sistémicamente, y luego de uno a tres días el mismo puede ser encontrado en las amígdalas, los nódulos linfáticos retrofaríngeos, el timo y en los nódulos linfáticos mesentéricos. A los tres días post-infección el virus comienza a replicarse en las Placas de Peyer y se disemina a las células epiteliales intestinales destruyendo las mismas (Truyen, 2000). El virus es excretado en las heces de los canes infectados, las cuales actúan como reservorio de la infección. La alta resistencia del virus a condiciones ambientales extremas, y su resistencia a los desinfectantes más comunes permiten que pueda mantenerse viable en el ambiente por largos períodos de tiempo (Truyen, 2000).

La parvovirus canina presenta dos sintomatologías típicas: en los cachorros neonatales generalmente provoca miocarditis aguda con alta mortalidad (Robinson *et al.*, 1979), y en los mayores a dos meses de edad provoca gastroenteritis hemorrágica (Appel *et al.*, 1979a; Robinson *et al.*, 1980). Los síntomas más comunes de la gastroenteritis son anorexia, depresión, fiebre, vómito y diarrea sanguinolenta y maloliente, los cuales producen a su vez una marcada pérdida de peso y deshidratación. La recuperación del estado normal del intestino delgado puede requerir un período de dos o tres semanas después de la infección, momento en el cual el animal comienza a recuperar su peso normal. La enfermedad puede ser incluso hiperaguda y conducir muchas veces a la muerte del animal en un plazo de 48 a 72 horas después de la manifestación de los primeros síntomas. Los cuadros de parvovirus pueden verse también exacerbados por infecciones concurrentes con *Giardias*, *Ancilostomas*, y *Coronavirus canino* entre otros (Truyen, 2000).

Por otro lado, la enfermedad puede presentarse de forma asintomática en los canes de edad avanzada, en cachorros correctamente inmunizados o en aquellos expuestos a una baja concentración viral ya que la severidad de la infección está relacionada a la cantidad de virus a la que el animal se expone. En estos casos el perro esparce el virus sin ser percibido, lo que

evita que se pueda tomar las precauciones adecuadas. Del mismo modo, los individuos infectados pueden excretar el virus antes de manifestar los signos clínicos de la enfermedad, así como hasta tres semanas después de haber adquirido la infección y estar en fase de recuperación.

2.3. Diagnóstico

El diagnóstico clínico primario de la enfermedad lo realiza el médico veterinario mediante la observación de los signos clínicos que el animal presenta. Debido a que los síntomas típicos de la parvovirus también pueden ser producidos por otros patógenos, se requiere de exámenes de laboratorio para su diagnóstico específico.

Dentro de los exámenes de laboratorio utilizados para el diagnóstico de Parvovirus canino se encuentra la microscopía electrónica (ME) directa a partir de muestras fecales (Fig. 1). En general, para realizar un diagnóstico con esta técnica se requiere alrededor de 10^3 partículas virales por gramo de heces (Roseto *et al.*, 1980). Asimismo, se trata de una técnica costosa y que requiere equipamientos y manejo especiales.

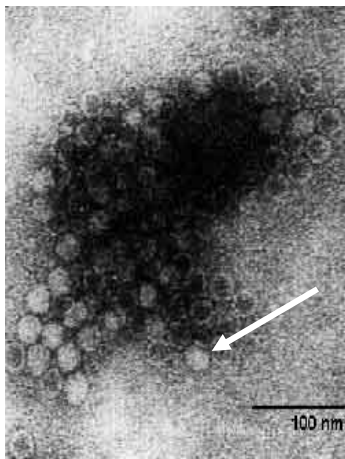


Figura 1. Partículas de parvovirus en las heces de un perro infectado. Se indica con una flecha la partícula viral. Micrografía Electrónica. Tomado de www.b19virus.com

La inmunocromatografía (IC) es otro método de diagnóstico utilizado por su simple y rápido procedimiento. Esta técnica puede ser realizada tanto por veterinarios como por propietarios de animales. Sin embargo, se requiere grandes cantidades de antígeno viral para que se produzca una señal claramente visible por lo que los resultados pueden ser afectados por la subjetividad del operador (Desario *et al.*, 2005).

La prueba de ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) también es un método rápido y eficaz de diagnóstico, y puede realizarse de manera ágil y relativamente económica por personal veterinario. Al igual que la ME, requiere una cantidad de partículas virales del orden de 10^3 por gramo de heces. Esta metodología permite además detectar anticuerpos IgM

específicos para CPV-2, los cuales aparecen en las etapas tempranas de la infección y desaparecen entre las dos y tres semanas después de la misma (Truyen, 2000).

Debido a que los parvovirus presentan la propiedad de unión a ácido siálico (SA), la prueba de hemoaglutinación e inhibición de la hemoaglutinación (HA-HI) se puede utilizar como método de diagnóstico. Éste es un método simple y rápido para detectar el virus en materia fecal y en muestras de tejidos. Sin embargo, su utilización se ve obstaculizada por el hecho de que existen cepas carentes de actividad de hemoaglutinación (Cavalli *et al.*, 2001). Además, esta técnica suele ser menos sensible que la ME o el ELISA (Truyen, 2000).

Por otro lado, también puede realizarse aislamiento viral (VI) para el diagnóstico de CPV-2 utilizando varias líneas celulares de origen felino y canino. Esta metodología es más sensible que las técnicas de ELISA, IC o HA-HI, aunque es poco utilizada como técnica de diagnóstico ya que se requiere como mínimo una semana para obtenerse el resultado y sólo puede realizarse en laboratorios especializados (Desario *et al.*, 2005). Además, se requiere que las partículas virales se encuentren intactas para que puedan ingresar a las células y realizar su ciclo replicativo.

En la actualidad, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una de las metodologías más ampliamente utilizadas como diagnóstico molecular, permitiendo la rápida generación *in vitro* de millones de copias idénticas de la secuencia de DNA blanco. Se trata de una técnica altamente sensible ya que requiere unas pocas moléculas del DNA de interés para comenzar con la amplificación. Asimismo, presenta una gran especificidad dada por la utilización de cebadores específicos que se hibridan con la secuencia complementaria en el DNA molde. Utilizando procedimientos sencillos de extracción de DNA a partir de materia fecal, esta técnica comenzó a ser empleada como método de diagnóstico de CPV-2 en 1995 (Schunck *et al.*, 1995). Recientemente se ha desarrollado para la detección y cuantificación de Parvovirus canino, una técnica de PCR en tiempo real (rt-PCR) basada en la tecnología Taqman de sondas específicas de hibridación, la cual mostró ser altamente específica, sensible y reproducible, así como más rápida que el método convencional basado en la PCR a tiempo final (Decaro *et al.*, 2005). Además de detectar y cuantificar el virus, la tecnología TaqMan permite simultáneamente caracterizar la variante de CPV-2 presente en la muestra, prescindiendo de técnicas adicionales (análisis de patrones de restricción y secuenciación) requeridas con la PCR convencional. No obstante, el alto costo de los equipamientos y reactivos necesarios para llevar a cabo el diagnóstico por rt-PCR impide que muchos laboratorios dispongan de dicha técnica. Además, para la caracterización de nuevas cepas es conveniente obtener la secuencia de los amplicones por métodos convencionales de PCR y

secuenciación, ya que esto nos brinda mayor información sobre la variabilidad del genoma viral.

2.4. Genoma viral

El genoma de CPV-2 está constituido por una monohebra de DNA de aproximadamente 5,2 Kb y de polaridad negativa que, por convención se representa en dirección 3'-5' (Berns, 1990).

El DNA viral posee dos unidades transcripcionales (Reed *et al.*, 1988) (Fig. 2). El transcripto de la primer unidad transcripcional produce los RNA mensajeros de las proteínas no estructurales (NS1 y NS2) por un mecanismo que implica un corte y empalme alternativo en el mensajero de la NS2 (Hoelzer *et al.*, 2008). Este mecanismo genera un cambio en el marco de lectura a partir del sitio de remoción del intrón, por lo que las proteínas NS1 y NS2 son idénticas en su extremo N-terminal pero difieren en el extremo C-terminal (Fig. 2).

El transcripto generado por la segunda unidad transcripcional produce los RNA mensajeros de las proteínas estructurales (VP1 y VP2), también por procesamiento diferencial (Reed *et al.*, 1988). La secuencia completa de VP2 está presente en VP1, que contiene un dominio N-terminal adicional de 143 aminoácidos (Hoelzer *et al.*, 2008) (Fig. 2).

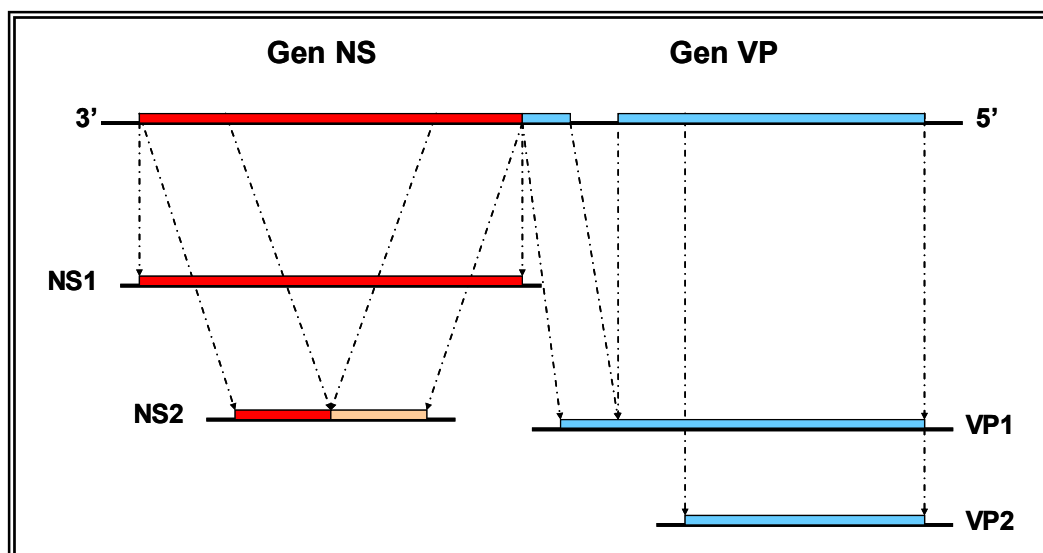


Figura 2. Esquema del corte y empalme alternativo que ocurre en ambas unidades transcripcionales del genoma de CPV-2. Se producen cuatro RNA mensajeros a partir de dos unidades transcripcionales. Las proteínas NS1 y NS2 presentan igual extremo N-terminal, sin embargo, el corte y empalme alternativo cambia el marco de lectura en la segunda mitad de la proteína NS2 generando un extremo C-terminal distinto al de la proteína NS1. Las proteínas VP1 y VP2 presentan el extremo C-terminal idéntico, pero VP1 presenta un dominio N-terminal adicional.

Al igual que todos los parvovirus autónomos, CPV-2 posee secuencias palindrómicas en ambos extremos de su genoma. Estos palíndromos son diferentes en cada extremo y se pliegan sobre sí mismos para actuar como cebadores durante la replicación (Berns, 1990).

Un hecho notable en la estructura del genoma del parvovirus canino es la presencia de unidades de repetidos directos ubicados hacia el extremo 5' del genoma viral (extremo derecho). Según la cepa de referencia de CPV-2 (número de acceso M19296 en la base de datos GenBank) existen dos grupos de repetidos en dicha región viral (Reed *et al.*, 1988) (Fig. 3). El primer grupo de repetidos está compuesto por dos monómeros: uno que flanquea el codón stop del gen VP1/VP2 y tiene 61 nucleótidos, y otro posterior que posee 62 nucleótidos y presenta una inserción de una A entre la posición 15 y 19, y una transición C→T en la posición 29. El segundo grupo de repetidos está compuesto por tres monómeros de 62 nucleótidos cada uno. Los dos primeros presentan secuencias idénticas (representadas en dirección 5'-3'), mientras que el tercer monómero presenta una transversión G→T en la novena base del repetido (Reed *et al.*, 1988) (Fig. 3). Estos repetidos también están presentes en otros virus de la subfamilia *Parvovirinae* como el FPLV, MEV y RPV.

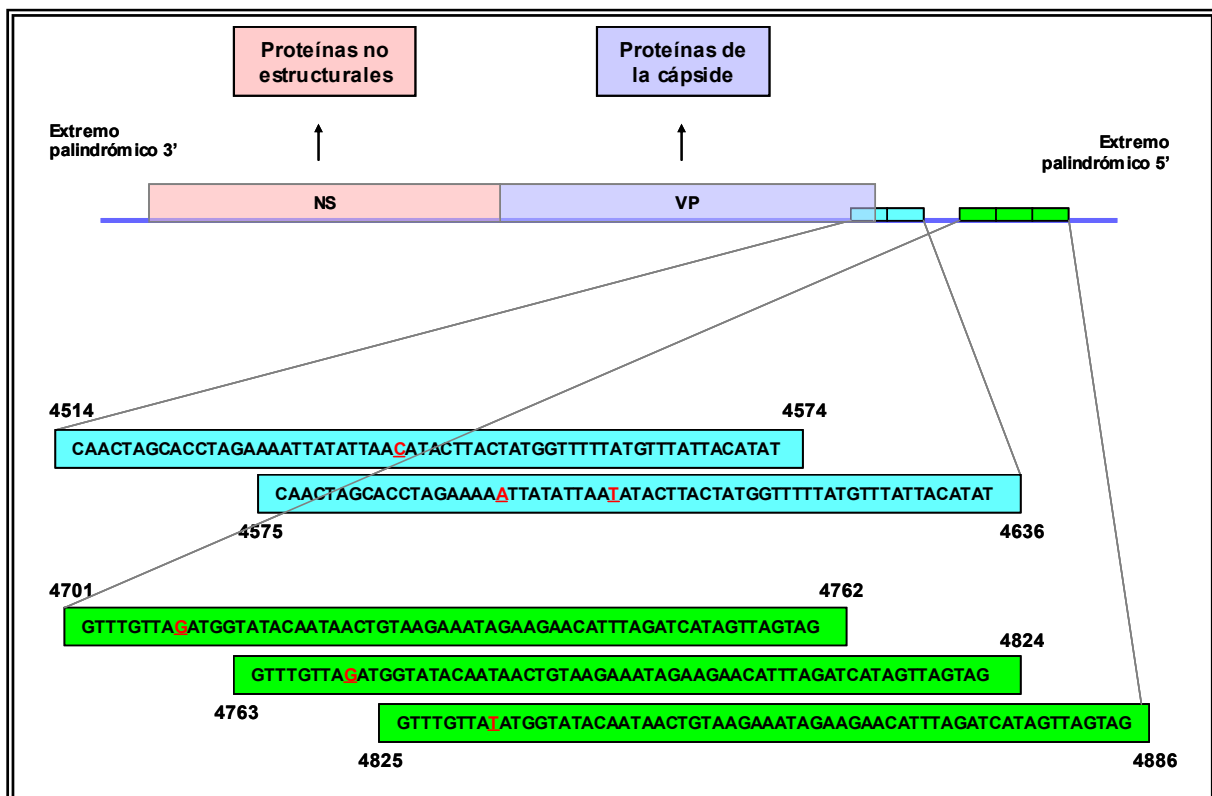


Figura 3. Esquema del genoma de una cepa de referencia de CPV-2 (número de acceso M19296 en la base de datos GenBank). Se indica los dos grupos de repetidos localizados en el extremo 5' del genoma. Se numera la posición que abarcan cada uno de los monómeros de repetición y se muestra la secuencia en sentido 5'-3' de la hebra complementaria. Las variaciones en las bases se muestran en rojo subrayado.

2.5. Proteínas virales

A pesar de su pequeño tamaño, el genoma de los parvovirus puede generar varias proteínas con múltiples funciones que garantizan un ciclo viral altamente efectivo.

VP2 es la proteína mayoritaria de la cápside por lo que se requiere para ensamblar la misma y empaquetar el genoma viral en su interior. Esta proteína también le permite al virus ingresar a la célula a través de su interacción con el receptor celular de la transferrina (TfR). Por esta razón, unos pocos cambios en la secuencia de aminoácidos de la VP2 pueden variar el grado de afinidad con su receptor celular, lo que podría alterar la capacidad infectiva y el rango de hospedero del virus. Esta proteína, también ha sido implicada en la interacción con ácido siálico (SA), asimismo, juega un rol importante en el proceso de infección celular ya que posee actividad fosfolipasa A2. Sus sitios antigénicos son el principal blanco de los anticuerpos del hospedero, los cuales protegen contra la infección (Parrish & Kawaoka, 2005).

La proteína VP1 forma también parte de la cápside viral. Además, presenta secuencias básicas que podrían estar controlando los procesos de transporte nuclear (Parrish & Kawaoka, 2005). Adicionalmente, la observación de que se requiere VP1 para la infectividad sugiere que el dominio N-terminal adicional de la misma posee una función esencial (Spitzer *et al.*, 1997). Por otro lado, existe evidencia de que dicho extremo se localiza internamente y que ayudaría a neutralizar el DNA viral (Tsao *et al.*, 1991).

La proteína VP3 es el componente minoritario de la cápside y resulta de una escisión proteolítica post-traducciona de 15 a 20 aminoácidos del extremo N-terminal de VP2, expuesto hacia el exterior de la cápside. Dicha escisión se realiza posteriormente al ensamblaje de las partículas virales que contienen el genoma viral (partículas completas) (Tsao *et al.*, 1991). En las partículas virales carentes de genoma no se ha constatado la presencia de la proteína VP3 (Agbandje *et al.*, 1995).

La proteína NS1 posee una localización nuclear y está involucrada en el control de la replicación del DNA ya que reconoce, une y corta el DNA viral durante la replicación (Cotmore & Tattersall, 2003). A su vez, posee actividad helicasa y ATPasa, regula la expresión génica, y también controla el empaquetamiento del DNA dentro de la cápside (Daeffler *et al.*, 2003). Además, interviene en el control de la apoptosis celular después de la infección viral, y es la responsable del reconocimiento y unión a varias proteínas celulares (Nuesch *et al.*, 1998; Fields, 2006).

Por último, la proteína NS2 se encuentra en el núcleo y en el citoplasma, y a pesar de ser aún poco conocida, se cree posee un rol, de una manera dependiente del tipo celular y del hospedero, en el ensamblaje correcto (eficiente) de la cápside y en el tráfico de los componentes de la misma (Cater & Pintel, 1992; Miller & Pintel, 2002). Además, se presume que interviene en el proceso de regulación de la expresión génica, pero no parece tener un rol mayor en el ciclo viral (Wang *et al.*, 1998; Fields, 2006).

2.6. Estructura de la cápside parvoviral

El CPV-2 carece de envoltura lipídica y posee una cápside de 26 nm de diámetro formada por 60 subunidades compuestas por VP1, VP2 y VP3, las cuales se ensamblan en un icosaedro con un número de triangulación $T=1$ (Fields, 2006). La proteína VP2 posee una estructura común en forma de barril β , compuesto por ocho láminas β antiparalelas, conectadas a través de α hélices que forman lazos o “loops” (Tsao *et al.*, 1991; Agbandje *et al.*, 1995) (Fig. 4). La superficie de la cápside viral está formada principalmente por dichos “loops”, dentro de los cuales se han mapeado estructural y genéticamente varias propiedades biológicas tales como el rango de hospedero, el tropismo celular, la unión al receptor celular, y propiedades antigénicas. Las inserciones entre las cadenas βD y βE del barril β forman una cinta β (β -ribbon) antiparalela, la cual junto a inserciones similares en otros cuatro polipéptidos cercanos forman un cilindro en el eje de simetría 5 de la cápside viral, allí se encuentra una abertura a la superficie viral por donde se cree que VP2 es externalizada para su escisión en VP3 en las partículas maduras.

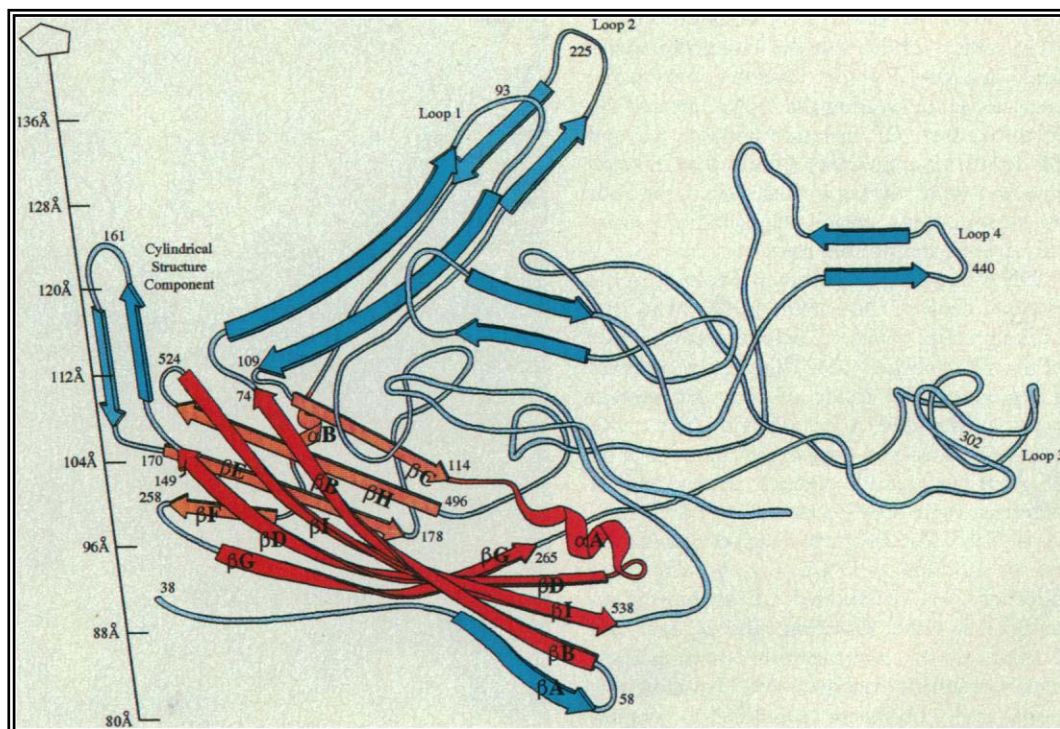


Figura 4. Diagrama en cinta de la topología de la proteína VP2. La distancia radial en ángstroms aproximada desde el centro viral se muestra a lo largo del eje de simetría 5. En rojo se muestra la estructura en forma de barril β constituida por 8 láminas β , y en azul las inserciones entre las mismas incluidos los loops que conforman la superficie de la cápside. Tomado de Tsao *et al.*, 1991.

Otros rasgos de la cápside parvoviral incluyen protusiones en forma de espina en el eje de simetría 3, una depresión en forma de cañón en el eje 5, y una en forma de hoyuelo en el

eje 2 (Fig. 5). En las protusiones del eje 3 se han mapeado regiones antigénicas, y dentro de la depresión del eje 2 sitios relacionados con la unión al receptor celular (Fields, 2006).

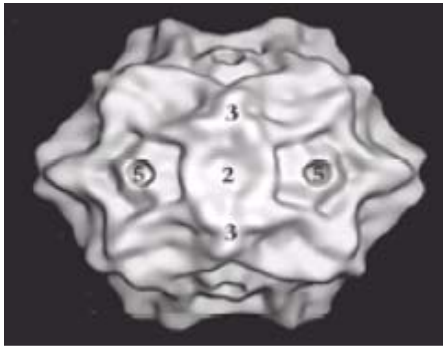


Figura 5. Estructura del Parvovirus. Micrografía crioelectrónica del CPV-2 mostrando algunos rasgos de la superficie viral. Se muestra los ejes de simetría 2, 3, y 5. Tomado de Fields (2006).

2.7. Ciclo replicativo

El virus ingresa a la célula blanco a través de su interacción con el receptor celular de la transferrina (TfR). El TfR es una proteína transmembrana presente en todas las células del organismo, a excepción de los eritrocitos maduros, y es responsable de la unión y transporte del hierro circulante hacia el interior de las células (Skikne, 1998). Aunque el virus también posee la capacidad de unirse a ácido siálico en la superficie de algunas células, esta propiedad no parece ser importante para la infección viral ya que viriones mutantes para dicha capacidad retienen la infectividad (Barbis *et al.*, 1992). La internalización del virus en la célula se produce mediante un proceso que implica vesículas de endocitosis recubiertas de clatrina. En una etapa posterior del proceso, el virus puede ser encontrado en lisosomas, donde se cree que el bajo pH es requerido para la infección o para el tráfico posterior del virión (Vihinen-Ranta *et al.*, 2004). A continuación, ocurre la penetración del virus al citosol, este es un proceso lento y aún desconocido, no obstante, se piensa que estaría implicada la lisis de las vesículas endosomales. El virión sería liberado en una localización perinuclear, donde posiblemente ocurra la exposición sobre la superficie de la cápside, de los extremos N-terminales de las proteínas VP1 y VP2, así como el extremo 3' del genoma viral. Asimismo, existe evidencia de que la cápside es alterada en el citosol por la actividad del proteosoma celular, posiblemente generando la formación intracelular de la proteína VP3 (Vihinen-Ranta *et al.*, 2004). A posteriori, el virión es transportado desde el citosol hacia el núcleo mediante la utilización de microtúbulos. La modificación de las proteínas de la cápside por el proteosoma celular expone secuencias de localización nuclear (NLSs). Estas secuencias son necesarias para el ingreso del virión al núcleo, por lo cual este último proceso es un fenómeno específico, y activo ya que implica la utilización de ATP y factores citósolicos solubles (Vihinen-Ranta *et al.*, 2004).

El modelo consenso ilustrado en la figura 6 para la replicación del DNA de los parvovirus se propuso a partir de los trabajos en MVM (Virus diminuto de ratón), un miembro prototipo de los parvovirus autónomos. Sin embargo, aún existen pasos significantes que no están claramente sustentados con evidencia experimental, por lo tanto, el modelo debe ser considerado como un ejemplo de cómo los parvovirus autónomos pueden duplicar su genoma generando intermediarios replicativos (Fields, 2006). Debido a que todas las DNA polimerasas conocidas requieren un cebador con un 3'OH libre para comenzar con la síntesis, y ésta ocurre en sentido 5'-3', los genomas DNA han tenido que desarrollar distintas estrategias para mantener su extremo 5' intacto. Como se ha descrito, los genomas de los parvovirus han desarrollado secuencias palindrómicas terminales que resultan indispensables para una replicación exitosa (Fig. 6). Se asume que el extremo 3' (izquierdo) se pliega sobre sí mismo para servir como cebador en la iniciación de la síntesis de la hebra complementaria (Berns, 1990). La síntesis del DNA complementario genera un intermediario replicativo doble hebra (dsRF). Cuando la síntesis alcanza el extremo 5' (derecho), que también se ha plegado sobre sí mismo, se cree que ocurre una ligación entre la hebra complementaria recientemente sintetizada y la hebra parental, resultando en una molécula doble hebra covalentemente cerrada en ambos extremos (cRF). Subsecuentemente, la proteína viral NS1 corta la hebra complementaria a unos 18-26 nts del extremo 5' parental plegado, y se produce una unión covalente entre dicha proteína y el extremo 5' libre generado (Fields, 2006). Este hecho origina un extremo 3'OH que es usado para reparar el extremo derecho generando una forma dúplex extendida del mismo. Luego, el extremo derecho extendido forma un intermediario doblemente plegado (configuración denominada orejas de conejo) que provee un nuevo 3'OH libre para la reiniciación de la síntesis por desplazamiento de la hebra genómica. Esto conduce a la formación de concatémeros (dímeros de dsRF), los cuales posteriormente son resueltos en un dsRF con el extremo izquierdo covalentemente cerrado, y otro con ambos extremos abiertos (Fig. 6). A continuación, este último provee la hebra negativa del virus a ser encapsidada, mientras que la hebra positiva vuelve a sufrir replicación. A su vez, el dsRF con el extremo izquierdo covalentemente cerrado vuelve a entrar en el proceso de replicación. Cuando el genoma viral es encapsidado, las 18-26 bases 5' terminales adicionales observadas en los intermediarios replicativos se extienden hacia el exterior de la cápside para ser subsecuentemente removidas (Berns, 1990).

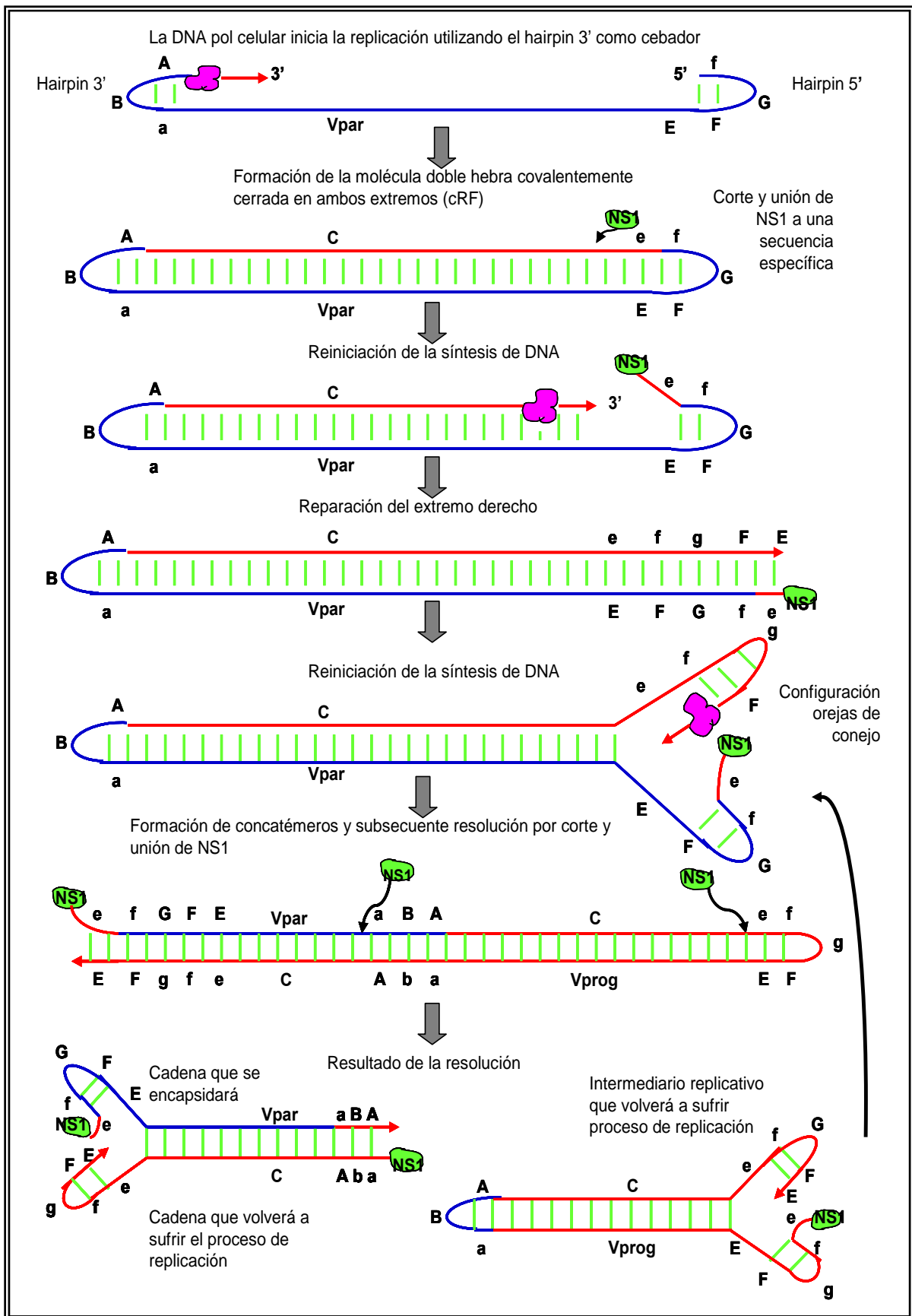


Figura 6. Modelo de replicación del genoma de MVM. Abreviaciones: ABA, palíndromo 3' terminal de la hebra parental del virión; FGf, palíndromo 5' terminal de la hebra parental del virión; e, secuencia de 18-26 bases presente en los intermediarios replicativos pero no en el DNA de viriones maduros; *Vpar*, hebra del virión parental; *Vprog*, hebra del virión progenie; C, hebra complementaria.

Debido a que una o ambas proteínas NS son proteínas regulatorias, su síntesis parece ocurrir primero que la de las proteínas estructurales. Una vez sintetizadas, estas proteínas migran al núcleo para actuar en la regulación de la expresión génica viral, en la replicación del genoma vírico y el empaquetamiento de los nuevos viriones. Al igual que éstas, las proteínas estructurales, una vez traducidas en el citoplasma, deben migrar al núcleo para participar en el ensamblaje de las nuevas partículas virales (Berns, 1990). Los viriones emergen de la célula lisándola, lo que conduce al efecto citopático observado para las células infectadas por este virus.

Además del requerimiento de la proteína viral NS1, se requieren otras proteínas celulares auxiliares y la(s) DNA polimerasa(s) celular(es) para el ciclo replicativo de MVM. Ensayos de inhibición indican que la DNA polimerasa α así como la DNA polimerasa γ estarían involucradas en la replicación del genoma parvoviral, pero aún no se ha podido determinar si la DNA polimerasa δ también estaría implicada (Berns, 1990).

2.8. Origen y evolución

El CPV-2 fue detectado por primera vez en 1978 en Estados Unidos, y casi simultáneamente en Australia y Europa (Appel *et al.*, 1978). Fue nombrado de esta forma para diferenciarlo del CPV-1 (Parvovirus canino tipo 1) previamente descrito con el cual, a pesar de compartir un cuadro clínico similar, no se encuentra evolutivamente relacionado (Truyen, 2000). Pese a su primer reporte a fines de la década del 70, estudios serológicos posteriores indicaron que el CPV-2 estaba presente en Europa en 1976 (Schwers *et al.*, 1979). Adicionalmente, Koptopoulos *et al.* (1986) reportó anticuerpos neutralizantes de CPV-2 en sueros de canes de Grecia de 1974. Sin embargo, los autores remarcan que sus estudios podrían haber detectado otros parvovirus relacionados, o quizá el ancestro de CPV-2. Por otro lado, Shackelton *et al.* (2004) estimaron la tasa de evolución molecular del parvovirus canino y sugirieron que el CPV-2 ancestral emergió en la población canina en 1968.

La hipótesis del origen de CPV-2 más aceptada propone la emergencia de éste a partir de una variante del Virus de la panleucopenia felina (FPLV) o de un virus estrechamente relacionado, como el Parvovirus del mapache (RPV) o Virus de la enteritis del visón (MEV). Es probable que este virus haya infectado algún miembro de la familia *Canidae*, como lobos y zorros, que actuaron como reservorio del ancestro de CPV-2 (Truyen *et al.*, 1998).

La variante original denominada CPV-2 fue inicialmente caracterizada por inmunofluorescencia indirecta con anticuerpos contra FPLV (Appel *et al.*, 1978), por lo cual se presumió que correspondía a una variante de FPLV con la capacidad de infectar canes. El

análisis de la secuencia aminoacídica de la VP2 de este nuevo virus reveló que existían cinco diferencias aminoacídicas (Lys-80-Arg, Lys-93-Asn, Asp-323-Asn, Asn-564-Ser, Ala-568-Gly) con respecto a FPLV (Hueffer *et al.*, 2003) (Tabla I). Los cambios en los residuos 93 y 323 serían los responsables del cambio en el rango de hospedero que permitió a CPV-2 infectar canes, por lo contrario, los cambios en los residuos 80, 564, y 568 habrían provocado la incapacidad de infectar gatos (Hueffer *et al.*, 2003).

En 1979 y 1980, se detectó la presencia de una nueva variante antigénica de CPV-2 en varios países mediante ensayos con anticuerpos monoclonales, análisis con enzimas de restricción, y secuenciación. Dicha variante fue denominada CPV-2a, y se diferencia de la variante original (CPV-2) por seis cambios aminoacídicos (Met-87-Leu, Ile-101-Thr, Val-103-Ala, Ala-300-Gly, Asp-305-Tyr, Val-555-Ile) en la secuencia proteica de VP2 (Martella *et al.*, 2006) (Tabla I).

En 1984 una segunda variante antigénica llamada CPV-2b, fue caracterizada por la pérdida de un epítipo neutralizante reconocido por anticuerpos monoclonales (MAbs) utilizados en las tipificaciones. Dicha variante difiere de CPV-2a en dos aminoácidos (Asn-426-Asp y Ile-555-Val) de la cadena proteica de VP2 (Parrish *et al.*, 1991) (Tabla I). El cambio en la posición 426 es el responsable de la pérdida del epítipo neutralizante ya que dicho aminoácido se encuentra expuesto en el sitio antigénico mayor (epítipo A), localizado en el eje de simetría 3 de la cápside icosaédrica viral (Nakamura *et al.*, 2004). Por el contrario, el cambio en la posición 555 representa una reversión o retención de la secuencia de la variante original CPV-2.

En poco tiempo, CPV-2a y CPV-2b fueron reemplazando por completo al CPV-2 original a nivel mundial (Parrish *et al.*, 1991). Además, las variantes antigénicas extendieron su rango de hospedero ya que al contrario de la variante original, eran capaces de infectar canes y gatos domésticos (Truyen *et al.*, 1996), así como carnívoros salvajes, tales como el tigre siberiano, el zorro orejas de murciélago, y el guepardo (Steinel *et al.*, 2000). El rango de hospedero felino de las nuevas variantes antigénicas CPV-2a y CPV-2b está probablemente determinado por los cambios aminoacídicos en las posiciones 87, 300 y 305 (Steinel *et al.*, 2000).

Estudios recientes permitieron demostrar que el virus se encuentra en un activo proceso de evolución. En los últimos años, la mayoría de las cepas de CPV-2a y CPV-2b que se han aislado presentan la sustitución Ser-297-Ala en la proteína VP2, por lo cual han sido clasificadas como CPV-2a y CPV-2b nuevas (Truyen, 1999; Ikeda *et al.*, 2000; Buonavoglia *et al.*, 2001; Battilani *et al.*, 2001; Battilani *et al.*, 2002; Chinchkar *et al.*, 2006). Asimismo,

estas nuevas variantes presentan Val en la posición 555 al igual que el FPLV y el CPV-2 original (Tabla I).

En el año 2000, se detectó en Italia una nueva variante antigénica, denominada CPV-2c, la cual presenta Ala y Val en la posiciones 297 y 555 respectivamente, pero difiere de las anteriores en el sitio antigénico mayor ya que presenta Glu en la posición 426 de la proteína VP2 (Buonavoglia *et al.*, 2001) (Tabla I). Dicha variante circula actualmente con CPV-2a y CPV-2b en distintas partes del mundo ya que también ha sido detectada en Vietnam (Nakamura *et al.*, 2004), España (Decaro *et al.*, 2006), Alemania (Decaro *et al.*, 2007), Reino Unido (Decaro *et al.*, 2007), Estados Unidos (Hong *et al.*, 2007), Portugal (Vieira *et al.*, 2008), Tunisia (Touihri *et al.*, 2008) y Uruguay (Pérez *et al.*, 2007). A pesar de haber sido detectada en varios países del mundo, poco se sabe respecto a las propiedades biológicas de la variante CPV-2c ya que ha sido escasamente estudiada en profundidad.

	Posiciones aminoacídicas de VP2												
VIRUS	80	87	93	101	103	297	300	305	323	426	555	564	568
FPLV	Lys	Met	Lys	Ile	Val	Ser	Ala	Asp	Asp	Asn	Val	Asn	Ala
CPV-2	Arg	Met	Asn	Ile	Val	Ser	Ala	Asp	Asn	Asn	Val	Ser	Gly
CPV-2a	Arg	Leu	Asn	Thr	Ala	Ser	Gly	Tyr	Asn	Asn	Ile	Ser	Gly
CPV-2b	Arg	Leu	Asn	Thr	Ala	Ser	Gly	Tyr	Asn	Asp	Val	Ser	Gly
CPV-2a nueva	Arg	Leu	Asn	Thr	Ala	Ala	Gly	Tyr	Asn	Asn	Val	Ser	Gly
CPV-2b nueva	Arg	Leu	Asn	Thr	Ala	Ala	Gly	Tyr	Asn	Asp	Val	Ser	Gly
CPV-2c	Arg	Leu	Asn	Thr	Ala	Ala	Gly	Tyr	Asn	Glu	Val	Ser	Gly

Tabla I. Posiciones aminoacídicas variables entre FPLV, CPV-2, y sus variantes (CPV-2a, CPV-2b, CPV-2a nueva, CPV-2b nueva y CPV-2c).

La caracterización de las cepas circulantes en una determinada región es de gran importancia para entender su epidemiología y virulencia, así como el impacto de la vacunación y las estrategias de contención de la enfermedad. Asimismo, la tipificación de las variantes presentes, así como el análisis de los cambios existentes entre ellas es imprescindible para el estudio de la evolución del virus. Los virus DNA usualmente poseen una tasa de evolución relativamente baja, sin embargo el CPV-2 presenta una tasa de cambio muy elevada, más parecida a la de los virus RNA (Shackelton *et al.*, 2005). Esto puede explicar la rápida y constante evolución de CPV-2 observada durante su corta historia desde su primera descripción en 1978.

Los estudios evolutivos indican claramente que el CPV-2 cambia por la adquisición de mutaciones puntuales, particularmente en los genes de las proteínas de cápside. Éste constituye el mecanismo típico de variación del CPV-2 hasta ahora estudiado. No obstante, nosotros proponemos que también existen cambios en el número de secuencias repetidas dentro del genoma parvoviral. Analizando secuencias repetidas del extremo 5' de cepas de parvovirus de los últimos años, hemos observado que existe variación en el número de monómeros en el primer grupo de repetidos mencionado anteriormente (Fig. 3). Presumimos que una variación similar podría estar ocurriendo en el segundo grupo de repetidos por lo que proponemos analizarlos en el presente estudio.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general:

- Analizar la variabilidad del parvovirus canino en Uruguay.

3.2. Objetivos puntuales:

- Detectar y caracterizar muestras de parvovirus canino colectadas durante el año 2007 en el Uruguay.
- Analizar la región del genoma que incluye el segundo grupo de repetidos anteriormente mencionado en muestras de campo y vacunales.
- El aprendizaje de técnicas moleculares básicas como:
 - La PCR (Reacción en cadena de la polimerasa).
 - La técnica de RFLP (Análisis del Polimorfismo en el Largo del Fragmento de Restricción)
 - La clonación de fragmentos de DNA.
- El aprendizaje del manejo de programas bioinformáticos que permiten el análisis de secuencias de DNA.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Detección y caracterización de las cepas de parvovirus canino presentes en Uruguay

4.1.1. Obtención de las muestras

Se analizaron 47 muestras de materia fecal de canes presuntamente infectados con parvovirus provistas por veterinarias de distintas partes del país durante el año 2007 (Tabla II). En general son remitidas muestras de cachorros con gastroenteritis hemorrágica, ya que esta sintomatología se asocia usualmente con la presencia de parvovirus.

Nº	Sintomatología	Edad	Vacunación	Procedencia
56	Gastroenteritis hemorrágica.	4 meses	Sin vacunas	Montevideo
57	Gastroenteritis. Anorexia. Fiebre. Depresión	3 meses	3 dosis	Canelones
58	Fiebre. Vómitos. Decaimiento	3 meses	2 dosis	Montevideo
60	DND	DND	DND	Montevideo
61	Gastroenteritis. Depresión	8 meses	3 dosis	Montevideo
62	Gastroenteritis hemorrágica.	10 meses	3 dosis	Lavalleja
64	Gastroenteritis hemorrágica.	2 meses	Sin vacunas	Canelones
65	Gastroenteritis hemorrágica	6 meses	3 dosis	Canelones
67	Gastroenteritis. Vómitos	6 meses	3 dosis	Montevideo
68	Gastroenteritis. Vómitos	DND	1 dosis	Canelones
69	Gastroenteritis hemorrágica.	DND	3 dosis	Canelones
70	Gastroenteritis hemorrágica.	3 años	Sin vacunas	Montevideo
71	Gastroenteritis hemorrágica.	7 meses	Sin vacunas	Montevideo
72	Inflamación anal. Fiebre	4 meses	4 dosis	Montevideo
76	Gastroenteritis hemorrágica	2 meses	3 dosis	Canelones
77	Gastroenteritis hemorrágica.	9 meses	DND	Montevideo
78	Gastroenteritis hemorrágica	7 meses	3 dosis	Canelones
79	Gastroenteritis. Vómitos	2 meses	Sin vacunas	Montevideo
80	Gastroenteritis hemorrágica	DND	Sin vacunas	Maldonado
82	Gastroenteritis hemorrágica	5 meses	2 dosis	Montevideo
83	Gastroenteritis hemorrágica	3 años	1 dosis	Montevideo
84	Gastroenteritis hemorrágica	4 meses	3 dosis	Montevideo
85	Gastroenteritis hemorrágica	3 meses	2 dosis	Maldonado
86	Gastroenteritis hemorrágica	5 meses	2 dosis	Maldonado
87	Gastroenteritis	5 meses	2 dosis	Maldonado
89	Gastroenteritis	6 meses	4 dosis	Montevideo
90	Gastroenteritis. Vómitos	22 meses	2 dosis	DND
91	Gastroenteritis hemorrágica	18 meses	Sin vacunas	Lavalleja
92	Gastroenteritis	3 meses	Sin vacunas	Maldonado
93	Gastroenteritis hemorrágica	40 días	Sin vacunas	Maldonado
94	Gastroenteritis hemorrágica	9 meses	3 dosis	Montevideo
95	Gastroenteritis hemorrágica	7 meses	3 dosis	Canelones
96	Gastroenteritis hemorrágica	35 días	Sin vacunas	Maldonado
97	Gastroenteritis hemorrágica	3 meses	Sin vacunas	Montevideo
98	Gastroenteritis	21 meses	4 dosis	DND

99	Gastroenteritis hemorrágica.	7 meses	Sin vacunas	Canelones
100	Gastroenteritis hemorrágica	6 años	Vacunado*	Montevideo
101	Gastroenteritis	3 meses	2 dosis	Montevideo
102	Gastroenteritis hemorrágica	2 meses	2 dosis	Montevideo
103	DND	DND	Sin vacunas	Montevideo
104	DND	DND	Sin vacunas	Montevideo
105	DND	DND	Sin vacunas	Canelones
106	DND	4 meses	Sin vacunas	Montevideo
107	Gastroenteritis hemorrágica	DND	2 dosis	Canelones
108	Gastroenteritis hemorrágica	3 meses	2 dosis	Montevideo
109	Gastroenteritis	3 meses	2 dosis	Montevideo
110	DND	DND	Vacunado*	San José

Tabla II. Muestras empleadas en la presente pasantía. Se indica número de las muestras, sintomatología, edad y vacunación de los canes, así como la procedencia de los mismos. Las muestras sombreadas corresponden a aquellas que resultaron positivas para CPV-2. DND: Dato no disponible. *Sin información sobre cantidad de dosis.

4.1.2. Extracción de DNA

La extracción del genoma viral a partir de materia fecal se realizó utilizando una modificación del método de “fast boiling” descrito anteriormente por Schunk *et al.* (1995). La técnica utilizada consistió en homogeneizar 0,1 g de materia fecal en 1 mL de PBS, hervir el homogeneizado durante 10 minutos para romper las células y partículas virales presentes, y enfriar en hielo por 5 minutos para inhibir posibles reacciones de enzimas presentes en la muestra. Luego, los remanentes celulares y contaminantes se precipitaron por medio de una centrifugación del homogeneizado a 3000 rpm durante 20 minutos. A continuación se extrajo el sobrenadante con el DNA viral y se almacenó a -20° C para su posterior amplificación por PCR.

4.1.3. PCR

La detección del virus en las muestras se realizó amplificando mediante PCR un fragmento de 1316 pares de bases de la proteína estructural VP2. Los cebadores utilizados fueron previamente diseñados en nuestro laboratorio y se detallan en la tabla III.

Cebador	Secuencia	Posición
F1Forward	AGATAGTAATAATACTATGCCATT	3316 - 3340
R3Reverse	CCTATATCAAATACAAGTACAATA	4609 - 4632

Tabla III. Cebadores utilizados en la amplificación del fragmento de 1316 nts. Se indica nombre, secuencia en sentido 5'-3', y la posición del genoma en la que hibrida cada uno de ellos.

Para la amplificación de las muestras se preparó, una mezcla de reacción de 20 μL con los reactivos que se detallan en la tabla IV. La PCR se realizó en un termociclador Perkin Elmer modelo 2400 utilizando el programa de ciclado detallado en la tabla V.

Reactivo	Concentración inicial	Concentración final	Volumen utilizado
Buffer de la Taq pol	10 X	1X	2 μL
MgCl ₂	25 Mm	2 mM	1,6 μL
Mezcla de dNTPs	10 μM	0,2 μM	0,4 μL
Cebador F1 forward	10 μM	1 μM	2 μL
Cebador R3 reverse	10 μM	1 μM	2 μL
Taq pol (Fermentas Inc. Hanover, MD)	5 U/ μL	0,3 U/ μL	0,12 μL
DNA dilución 1:10	–	–	2 μL
Agua bidestilada estéril	–	–	Csp 20 μL

Tabla IV. Reactivos y cantidades de los mismos utilizadas en la amplificación del fragmento de 1316 nts (amplicón F1for/R3rev). Se indica la concentración inicial y final de los reactivos, así como el volumen utilizado para cada uno de ellos. Csp: cantidad suficiente para.

	Etapa	Temperatura	Duración
30 ciclos	Desnaturalización inicial	94°C	10 minutos
	Desnaturalización	94°C	30 segundos
	Apareamiento	42°C	1 minuto
	Elongación	72°C	1 minuto
	Elongación final	72°C	10 minutos

Tabla V. Programa de ciclado utilizado para la amplificación del fragmento de 1316 nts. Se describen las etapas con sus respectivas temperaturas y duraciones, así como la cantidad de ciclos.

Los productos de PCR (5 μl) fueron corridos en un gel de agarosa al 0,8 % teñido con bromuro de etidio (concentración final de 0,6 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) y visualizados en un transiluminador con luz UV.

4.1.4. RFLP

La caracterización de las muestras de campo se llevó a cabo mediante el análisis del tamaño de los fragmentos de restricción (RFLP). El patrón de restricción se generó con la enzima *MboII* (Fermentas) que reconoce la secuencia específica GAAGA.

La digestión del amplicón de las cepas CPV-2/2a/2b con dicha enzima genera dos fragmentos de 703 y 612 pb con sitio de restricción en la posición 4006-4010 nts. Por otro

lado, el cambio nucleotídico T→A en la posición 4062 presente en la variante 2c (que produce el cambio al residuo Glu en la posición 426 de la proteína VP2) origina un sitio de restricción adicional para la enzima *MboII*, produciéndose dos cortes que generan tres fragmentos de 703, 56 y 556 pb (Fig. 7).

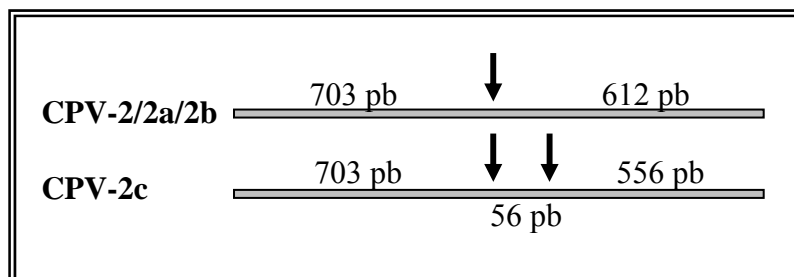


Figura 7. Patrón de RFLP de las variantes CPV-2/2a/2b y de la variante 2c. Los sitios de corte de la enzima de restricción *MboII* se representan con las flechas verticales. Las diferencias son producidas por la presencia de un sitio de restricción adicional en la variante 2c.

En la digestión se utilizaron los reactivos y cantidades de los mismos detallados en la tabla VI, la reacción fue incubada durante 2 horas a 37°C. A continuación, los productos de la digestión fueron analizados en geles de agarosa al 1,5 % teñidos con bromuro de etidio (concentración final de 0,6 µg/µL) en un transiluminador con luz UV para determinar el patrón de restricción de cada muestra.

Reactivo	Volumen (µL)
Producto de PCR	15,0
Buffer de la enzima (B) (Fermentas)	1,5
<i>MboII</i> (Fermentas)	0,6
Agua (Gibco)	12,9
Volumen total	30,0

Tabla VI. Reactivos y sus correspondientes volúmenes empleados en la reacción de restricción (RFLP).

4.2. Análisis de la región del segundo grupo de repetidos

Con el objetivo de caracterizar la región del segundo grupo de repetidos en las muestras de campo, se diseñaron cebadores para amplificar dicha región.

4.2.1. Diseño de cebadores

El diseño de los cebadores que amplifican el fragmento que incluye el segundo grupo de repetidos se realizó a partir de un alineamiento efectuado con el programa Clustal W del

BioEdit, en el mismo se utilizaron secuencias tomadas de la base de datos GenBank del National Center for Biotechnology Information (NCBI). A continuación, utilizando la herramienta Oligo Analyzer 3.0 de Integrated DNA Technologies, se realizaron los cálculos de temperaturas de melting (Tm) y contenido GC, así como se evaluó que no hubiese formación de estructuras secundarias y dímeros. Los cebadores diseñados se detallan en la tabla VII, los mismos amplifican un fragmento que abarca 365 pares de bases.

Cebador	Secuencia	Posición
REP forward	GCATAGAAATATTGTA CTTG	4660 - 4679
REP reverse	GACAGTATACGAGGCCATTTAG	5004 - 5025

Tabla VII. Cebadores utilizados en la amplificación del fragmento de 365 nts que incluye el segundo grupo de repetidos. Se indica nombre, secuencia en sentido 5'-3', y la posición en el genoma en la que hibrida cada uno de ellos. Las posiciones de hibridación están referidas a la secuencia de la cepa de referencia con número de acceso M19296 a la base de datos GenBank.

4.2.2. Cepas de campo

Se utilizaron cinco cepas de campo (4 CPV-2c y 1 CPV-2a) caracterizadas en nuestro laboratorio (Tabla VIII). Las muestras M6, M12 y M47 habían sido previamente tipificadas por el grupo de investigación, las muestras M52 y M120 fueron caracterizadas como CPV-2c en la presente pasantía.

Número de muestra	Caracterización	Nº de acceso
M6	CPV-2a	EF375482
M12	CPV-2c	EF375479
M47	CPV-2c	No submitidas
M52	CPV-2c	No submitidas
M120	CPV-2c	No submitidas

Tabla VIII. Muestras de campo utilizadas para el análisis de la secuencia nucleotídica de la región que contiene el segundo grupo de repetidos. Se indica número y variante a la que pertenece cada una, así como el número de acceso a la base de datos GenBank de las muestras que han sido submitidas a la misma.

4.2.3. Cepas vacunales

También se utilizaron con fines comparativos cepas vacunales CPV-2, 2a y 2b, incluidas en la formulación de las vacunas PDog, Vplus5 y DA₂PPVL, respectivamente.

4.2.4. Extracción de DNA vacunal

Para la extracción del genoma viral a partir de las vacunas se resuspendió el material liofilizado de las mismas en 1 mL de PBS para luego proseguir con el protocolo utilizado para las muestras de campo.

4.2.5. PCR

La amplificación del fragmento que incluye el segundo grupo de repetidos se realizó en un volumen final de reacción de 10 μ L con los reactivos que se detallan en la tabla IX, la secuencia y posición de hibridación de los cebadores utilizados en la misma se especifican en la tabla VII. Se utilizó el mismo programa de ciclado en el termociclador usado para el diagnóstico de CPV-2, excepto por la etapa de apareamiento, que se realiza en este caso a una temperatura de 52°C.

Reactivo	Concentración inicial	Concentración final	Volumen utilizado
Buffer de la Taq pol	10 X	1X	1 μ L
MgCl ₂	25 mM	2 mM	0,8 μ L
Mezcla de dNTPs	10 μ M	0,2 μ M	0,2 μ L
Primer REP forward	10 μ M	1 μ M	1 μ L
Primer REP reverse	10 μ M	1 μ M	1 μ L
Taq pol (Fermentas Inc. Hanover, MD)	5 U/ μ L	0,3 U/ μ L	0,06 μ L
DNA dilución 1:10	–	–	1 μ L
Agua bidestilada estéril	–	–	Csp 10 μ L

Tabla IX. Reactivos y cantidades de los mismos utilizadas en la amplificación del fragmento de 365nts (amplicón REPfor/REPrev) que incluye el segundo grupo de repetidos. Se indica la concentración inicial y final de los reactivos, así como el volumen utilizado para cada uno de ellos. Csp: cantidad suficiente para.

Luego, los productos de PCR fueron visualizados en geles de agarosa al 0,8 % teñidos con bromuro de etidio (concentración final de 0,6 μ g/ μ L) en un transiluminador con luz UV.

4.2.6. Clonación

La clonación de los amplicones de las muestras detalladas en la tabla VIII se realizó mediante el kit de clonación “GeneJet PCR Product Cloning kit” de FermentasTM utilizando células de *E. coli* XL1 Blue competentes (Ver Anexo I: Protocolos).

Las bacterias que no adquieren el plásmido pJET1/blunt (Fig. 8), no sobreviven en la placa LB agar ampicilina debido a que el plásmido es el responsable de conferir la resistencia al antibiótico. Asimismo, sólo las colonias transformadas con el plásmido que contiene un inserto se desarrollarán en la placa de petri, esto es así porque el plásmido pJET1/blunt posee un gen que se expresa como letal en las colonias que no contienen el inserto.

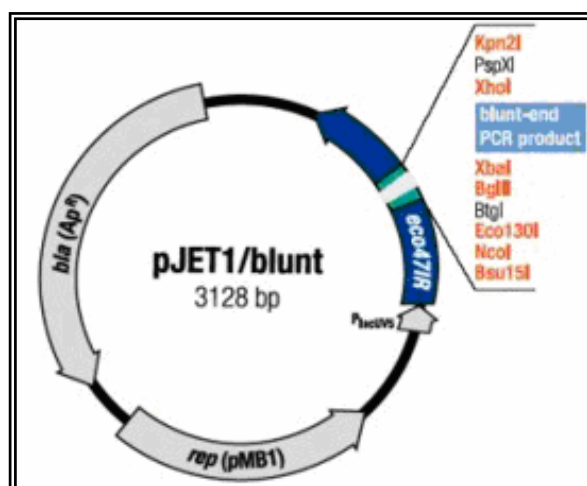


Figura 8. Esquema del vector de clonación pJET1/blunt.

Para revelar la presencia del fragmento de interés en las colonias transformadas, se realizó un “screening” por PCR empleando los mismos reactivos y cantidades utilizados para la amplificación de las muestras, excepto por la aplicación directa de las colonias para obtener el DNA molde. Asimismo, se incrementó el tiempo de desnaturalización inicial con el objetivo de lisar completamente las bacterias dejando libre el DNA molde. Luego, los productos fueron sometidos a electroforesis en geles de agarosa al 0,8 % teñidos con bromuro de etidio y observados bajo luz UV.

A seguir, los clones positivos fueron extraídos de la placa LB agar ampicilina para ser crecidos en 3 mL de medio LB líquido con 1,5 μ L de ampicilina (200 mg/mL). Los clones se incubaron a 37 °C toda la noche en agitador a 200 rpm con el fin de extraer posteriormente el DNA plasmídico de los mismos.

4.2.7. Extracción de DNA plasmídico

La extracción del DNA plasmídico de los clones positivos se efectuó mediante “Minipreps” a través de la técnica fenol-cloroformo modificada de Sambrook (ver Anexo I: Protocolos). La presencia del inserto en los minipreps obtenidos fue confirmada mediante la realización de una nueva reacción de PCR utilizando diluciones de los minipreps. Se trabajó utilizando el mismo programa de ciclado y cantidades de reactivos usados en el “screening”. Luego, se procedió a visualizar en un transiluminador los productos de PCR mediante electroforesis en geles de agarosa al 0,8 % teñidos con bromuro de etidio.

Los minipreps positivos para la PCR fueron cuantificados en gel de agarosa al 0,8 % mediante comparación de intensidad de bandas con un miniprep de concentración conocida para su posterior secuenciación.

4.2.8. Secuenciación

La secuenciación de los productos clonados se realizó en forma automática mediante un secuenciador ABI prism 377 – Perkin Elmer Automated Sequencer, empleando cebadores específicos del vector (pJET1f y pJET1r).

Los cromatogramas de las secuencias fueron revisados y editados utilizando el programa SeqMan 4.00 (DNASTAR Inc).

4.2.9. Análisis comparativo de los repetidos

Mediante la aplicación del algoritmo BlastN (Basic Local Alignment Search Tool-nucleotide) se buscaron secuencias similares en la base de datos GenBank, utilizando como secuencia “query” (consulta) la primera unidad de repetición del segundo grupo de repetidos de la cepa de referencia de CPV-2 con número de acceso M19296. Luego, se realizó un alineamiento de la secuencia de referencia M19296, las secuencias obtenidas en el BlastN, y las muestras clonadas aplicando el programa Clustal W del BioEdit.

5. RESULTADOS

5.1. Detección y caracterización del virus en las muestras

5.1.1. Detección del virus

Mediante PCR se obtuvo el amplicón de 1316 pb del gen de la proteína VP2 de CPV-2 (Fig. 9) en 34 de las 47 muestras analizadas (Tabla II).

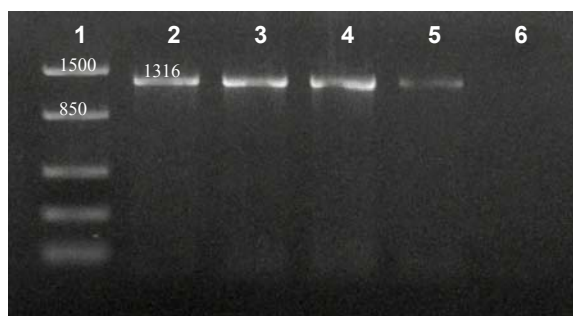


Figura 9. Electroforesis en gel de agarosa al 0,8 % de los amplicones F1for/R3rev. **1-** Marcador de peso molecular. **2-** M104. **3-** M105. **4-** M106. **5-** M107. **6-** M108.

5.1.2. RFLP

Los amplicones obtenidos fueron caracterizados mediante RFLP a fin de determinar la variante de CPV-2 a la que correspondían (Fig. 10). El patrón de restricción obtenido indica que todas las muestras pertenecían a la variante 2c. No se detectó la presencia de muestras de campo de tipo CPV-2, CPV-2a o CPV-2b.

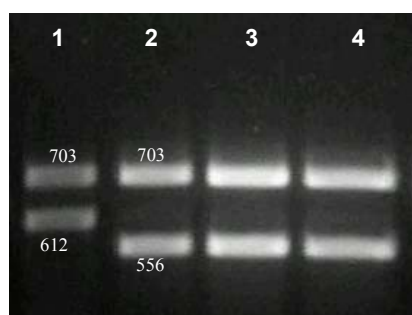


Figura 10. RFLP. Electroforesis en gel de agarosa al 1,5 % de los productos de PCR digeridos con la enzima de restricción *MboII*. **1-** M6 (EF375482): muestra de campo tipo 2a utilizada como referencia. **2-** M12 (EF37547): muestra de campo tipo 2c utilizada como referencia. **3-** M92. **4-** M93. El fragmento de 56 pb generado en la digestión de la variante tipo 2c no se muestra en el gel.

5.2. Análisis de la región del segundo grupo de repetidos

5.2.1. PCR

Se amplificó un fragmento que abarca el segundo grupo de repetidos presente en el genoma de CPV-2, con el fin de comparar el tamaño de los amplicones obtenidos en las variantes de CPV-2 existentes en Uruguay. Comprobamos que el amplicón de la cepa utilizada en la vacuna PDog, la cual corresponde a CPV-2 (M19296) y de la cual sabemos que

tiene tres monómeros de repetición, es de mayor tamaño que en las cepas de campo uruguayas y en las vacunales Vplus5 (CPV-2a) y DA₂PPVL (CPV-2b) (Fig. 11 y 12).

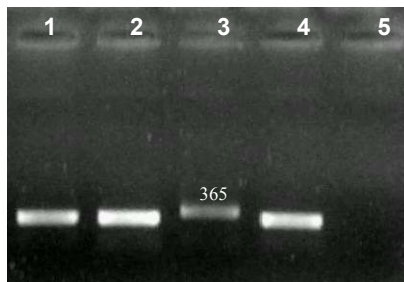


Figura 11. Electroforesis en gel de agarosa al 0,8% de los amplicones REPfor/REPrev. **1-** M6. **2-** M12. **3-** Vacuna PDog (CPV-2). **4-** M52. **5-** Control negativo (sin DNA).

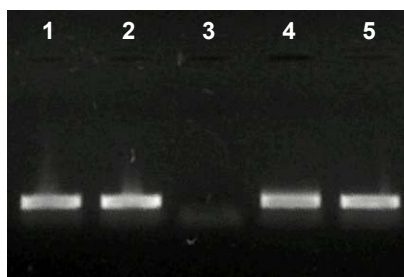


Figura 12. Electroforesis en gel de agarosa al 0,8% de los amplicones REPfor/REPrev. **1-** M6. **2-** M12. **3-** Control negativo (sin DNA). **4-** Vplus5 (CPV-2a). **5-** DA₂PPVL (CPV-2b).

5.2.2. Clonación

Los amplicones de las muestras de campo de la tabla VIII fueron clonados. A través del “screening” por PCR se determinó cuales colonias habían sido transformadas con el amplicón de interés (Fig. 13).

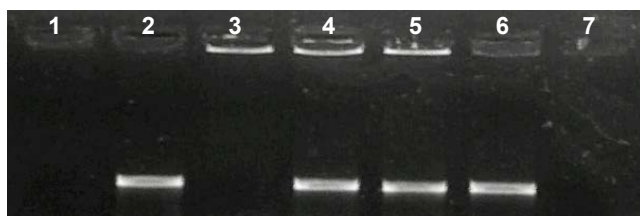


Figura 13. “Screening” de colonias de M12. **1-** Control negativo (sin DNA). **2-** Control positivo (M12). **3-** Colonia 1 de M12. **4-** Colonia 2 de M12. **5-** Colonia 3 de M12. **6-** Colonia 4 de M12. **7-** Colonia 5 de M12.

Luego de la extracción del DNA plasmídico de las colonias que presentaban el fragmento de interés, se realizó una nueva amplificación por PCR con el fin de verificar que el plásmido purificado contenía efectivamente el amplicón REPfor/REPrev (Fig. 14), el que posteriormente se envió a secuenciar.

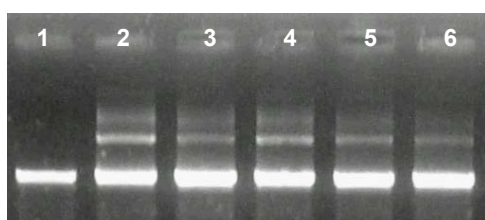


Figura 14. Electroforesis en gel de agarosa al 0,8 % de los amplicones REPfor/REPrev de los minipreps obtenidos. **1-** Control positivo (M6). **2-** Colonia 3 de M6. **3-** Colonia 2 de M12. **4-** Colonia 7 de M47. **5-** Colonia 11 de M52. **6-** Colonia 3 de M120.

5.2.3. Secuenciación

El análisis de las secuencias de los amplicones clonados nos permitió constatar que las cinco muestras efectivamente poseen un solo monómero de repetición (Fig. 15).

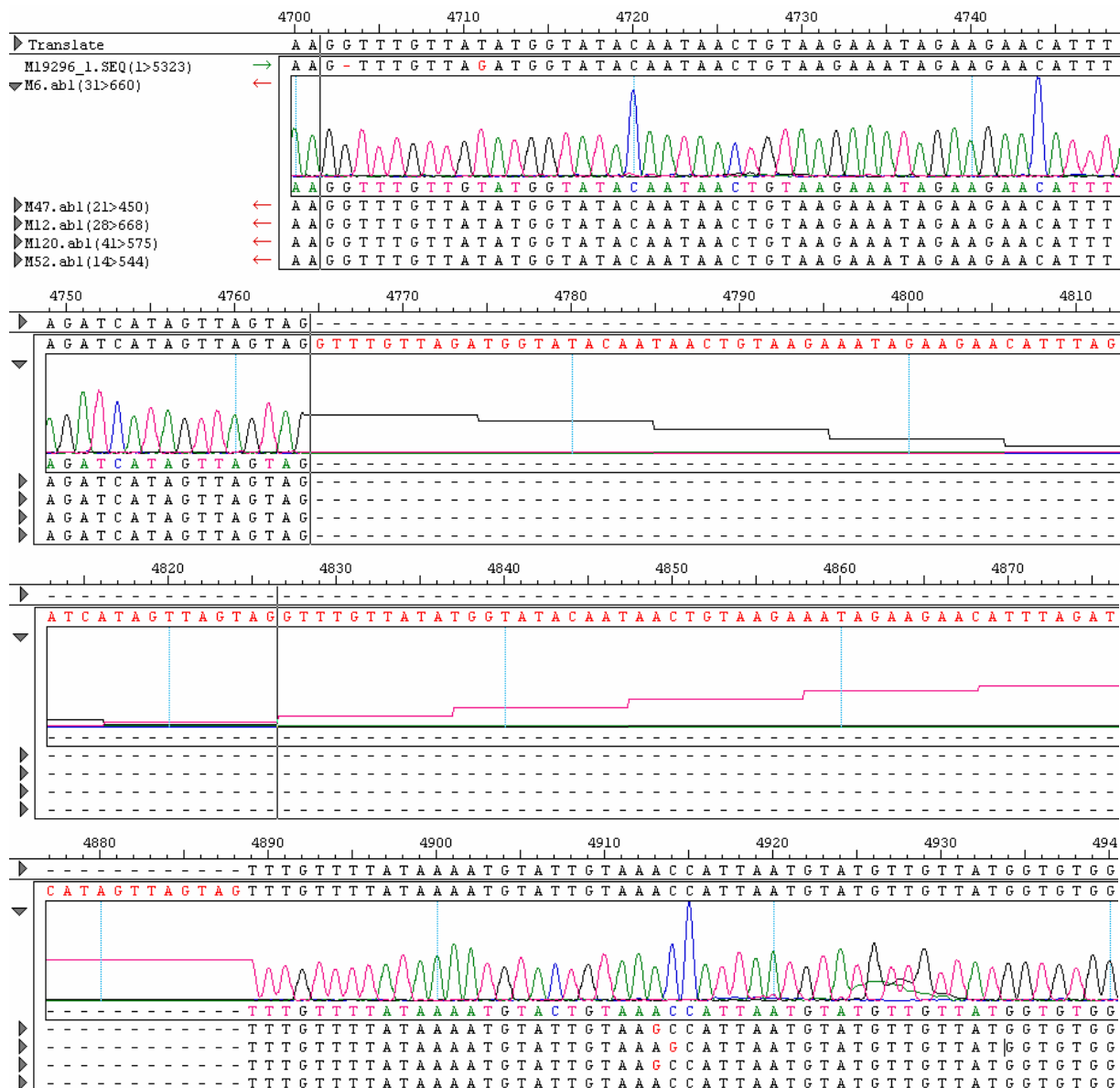


Figura 15. Análisis de las secuencias clonadas empleando el programa Seqman. Se muestra el cromatograma de la secuencia de M6. El primer monómero de repetido abarca desde 4702-4764 y se encuentra en todas las secuencias. Notar que los otros dos monómeros (4765-4826 y 4827-4888) están presentes en la cepa M19296 (CPV-2) pero no existen en los amplicones de las muestras uruguayas. Se simboliza con un guión las bases ausentes

5.2.4. Análisis comparativo de los repetidos

Utilizando como query un monómero del segundo grupo de repetidos de la secuencia M19296 en el algoritmo BlastN, se obtuvieron secuencias de distintos parvovirus (CPV-2,

FPLV, MEV y RPV) procedentes de varias partes del mundo (EEUU, Australia, Japón, Rusia y China) y distintos años (1984 – 2007) (Tabla X). Se obtuvieron 21 secuencias, entre ellas la propia secuencia utilizada como “query” que posee tres unidades de repetición, 19 secuencias con un único monómero correspondiente al tercer monómero de M19296, y una secuencia que posee dos monómeros (Fig. 16, Tabla X). La secuencia única (M10824) con dos unidades de repetición posee la primer unidad con la última base deleteada, y una deleción de 10 bases iniciales de la segunda unidad, la misma pertenece a FPLV y corresponde al año 1985 (Fig. 16, Tabla X).

Nº Acceso	Año	País	Virus	1 ^{er} monómero	2 ^{do} monómero	3 ^{er} monómero
M10989	1984	EEUU	CPV-2	Ausente	Ausente	Presente
M10824	1985	EEUU	FPLV	Ausente	Presente	Presente, deleción de las 10 pb iniciales
<u>M19296</u>	1988	EEUU	CPV-2	Presente	Presente	Presente
M23255	1988	EEUU	CPV-2	Ausente	Ausente	Presente
M23999	1988	EEUU	MEV-1	Ausente	Ausente	Presente
M24000	1988	EEUU	CPV-2a	Ausente	Ausente	Presente
M24001	1988	EEUU	MEV-2	Ausente	Ausente	Presente
M24002	1988	EEUU	FPLV	Ausente	Ausente	Presente
M24003	1988	EEUU	CPV-2a	Ausente	Ausente	Presente
M24004	1988	EEUU	FPLV	Ausente	Ausente	Presente
M24005	1989	EEUU	RPV	Ausente	Ausente	Presente
M38245	1990	EEUU	CPV-2	Ausente	Ausente	Presente
M38246	1990	EEUU	FPLV	Ausente	Ausente	Presente
X55115	1990	Australia	FPLV	Ausente	Ausente	Presente
D00765	1991	Japón	MEV	Ausente	Ausente	Presente
D26079	1993	Japón	MEV	Ausente	Ausente	Presente
AY665655	2004	Rusia	FPLV	Ausente	Ausente	Presente
AY665656	2004	Rusia	MEV	Ausente	Ausente	Presente
AY665657	2004	Rusia	MEV	Ausente	Ausente	Presente
EF011664	2006	China	CPV-2a	Ausente	Ausente	Presente
EF428258	2007	China	MEV	Ausente	ausente	Presente

Tabla X. Secuencias obtenidas a partir del blastN utilizando como query el primer monómero del segundo grupo de repetidos de la cepa de referencia CPV-2 con número de acceso M19296. Se indica el virus, el número de acceso en la base de datos GenBank, año, país de procedencia y ausencia o presencia de cada monómero de repetición del segundo grupo de repetidos. CPV-2: Parvovirus canino tipo 2; FPLV: Virus de la panleukopenia felina; MEV: Virus de la enteritis del visón; RPV: Parvovirus del mapache. La secuencia utilizada como “query” se subraya.

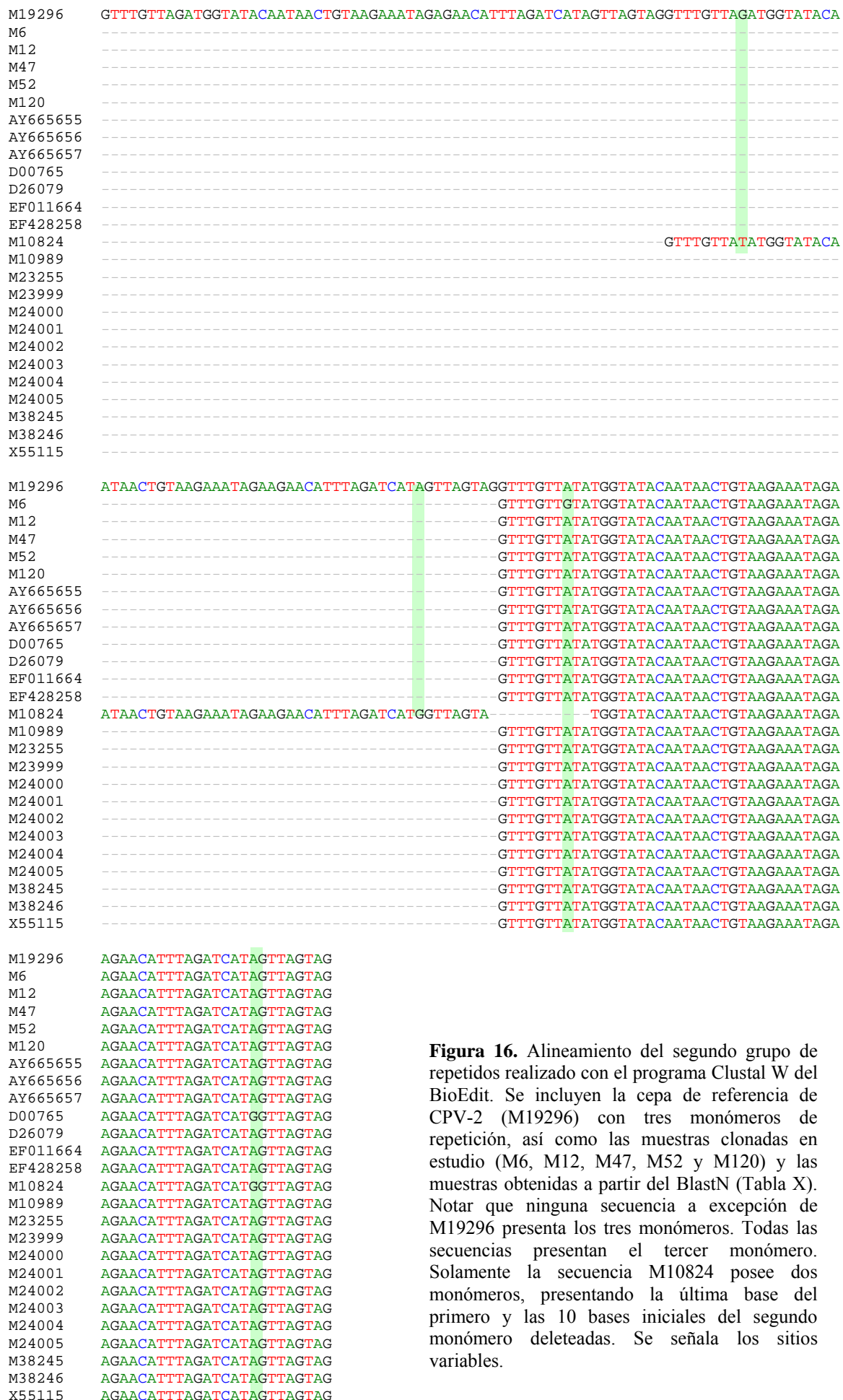


Figura 16. Alineamiento del segundo grupo de repetidos realizado con el programa Clustal W del BioEdit. Se incluyen la cepa de referencia de CPV-2 (M19296) con tres monómeros de repetición, así como las muestras clonadas en estudio (M6, M12, M47, M52 y M120) y las muestras obtenidas a partir del BlastN (Tabla X). Notar que ninguna secuencia a excepción de M19296 presenta los tres monómeros. Todas las secuencias presentan el tercer monómero. Solamente la secuencia M10824 posee dos monómeros, presentando la última base del primero y las 10 bases iniciales del segundo monómero deleteadas. Se señala los sitios variables.

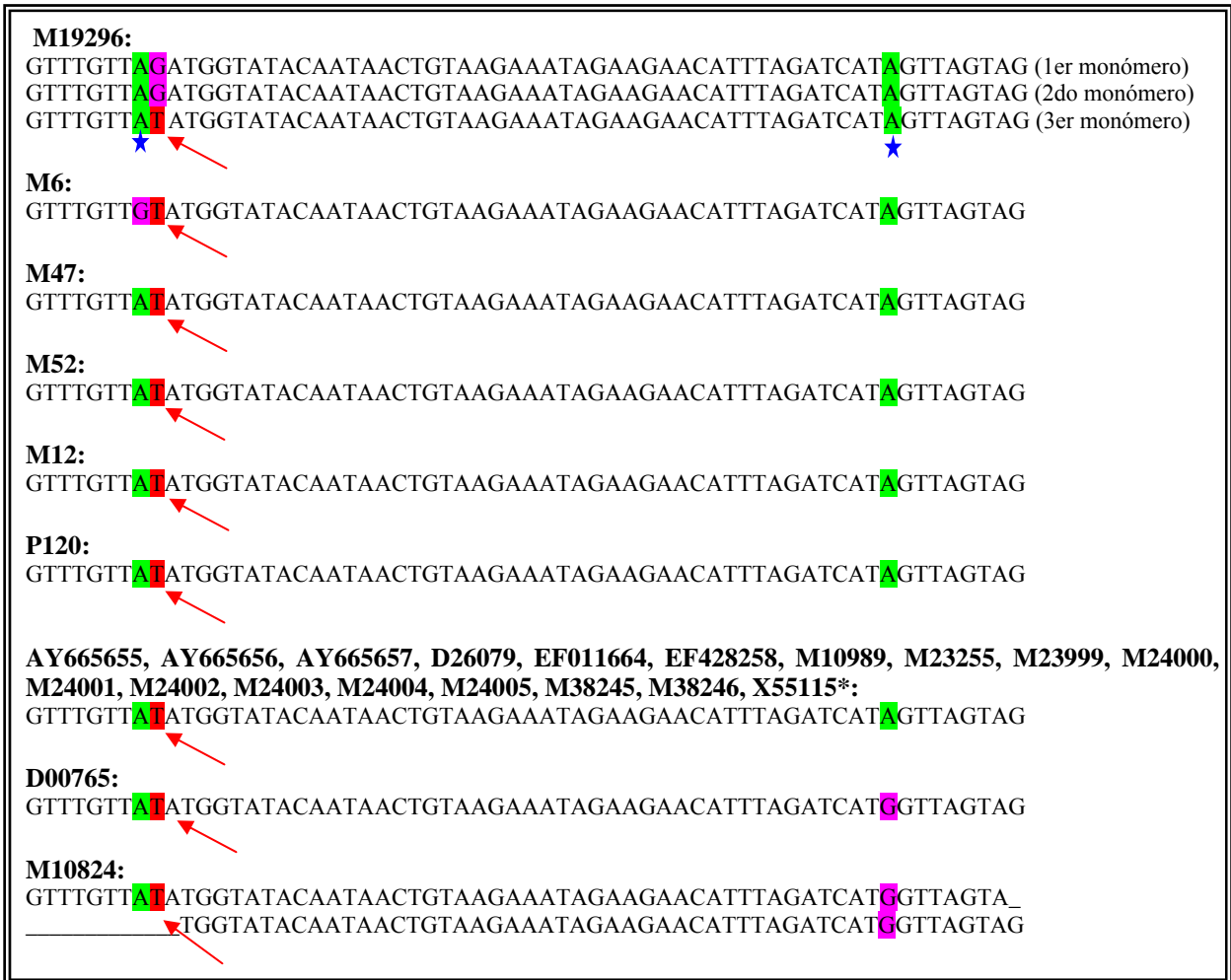


Figura 17. Esquema de las secuencias del segundo grupo de repetidos. Indicado con la flecha roja el sitio informativo que sugiere que los monómeros corresponden al tercero. Con las estrellas se indican los sitios que varían, y se colorean los correspondientes nucleótidos. Los sitios con deleciones se muestran con un guión.
 *Para simplificar las secuencias idénticas se muestran como una sola.

La comparación de los monómeros (Fig. 17) parece indicar que el único monómero presente en las secuencias clonadas y las obtenidas del GenBank, y el primer monómero de M10824, corresponde al último de los tres de M19296. Esto se basa en la presencia de una T en la novena posición (Fig. 17, flecha) en todas las secuencias con un único monómero y en el tercer monómero de la secuencia M19296. Asimismo, constatamos que el monómero presenta un bajo nivel de variación, observándose diferencias en solamente dos posiciones (Fig. 17, estrellas) y que las mismas corresponden a transiciones.

6. DISCUSIÓN

En la presente tesina se utilizó la técnica de PCR para la detección del parvovirus canino en muestras de perros presuntamente afectados con parvovirus. Otros métodos de diagnóstico utilizados rutinariamente en nuestro país se basan en la detección de partículas virales o anticuerpos anti-CPV-2. Los mismos presentan la desventaja de poseer menor sensibilidad ya que requieren grandes cantidades de virus o anticuerpos. Adicionalmente, en el caso de las técnicas que detectan partículas virales, la presencia de anticuerpos anti-CPV-2 en las muestras puede interferir en el resultado generando muchas veces falsos negativos. Si bien la técnica de PCR demanda equipamiento y personal especializado, cabe destacar que presenta un costo semejante a los de otras técnicas de laboratorio utilizadas en el diagnóstico del parvovirus canino, siendo además muy eficaz, sensible e informativa.

En nuestro estudio la detección de CPV-2 en 34 muestras de las 47 analizadas (72,3 %) indica que la mayoría de los casos de gastroenteritis hemorrágica en cachorros son causados por el CPV-2. El porcentaje restante de casos de gastroenteritis que resultaron negativos para CPV-2, probablemente se debieron a otros patógenos o a complicaciones vinculadas a la dieta y/o manejo del animal.

El trabajo aquí presentado también implicó la determinación de las variantes presentes en las muestras de parvovirus del año 2007. La caracterización de las variantes virales circulantes en una región dada es de gran importancia a la hora de entender varios aspectos referentes a la evolución del virus, incluyendo su origen, distribución y relación con las cepas de países vecinos. Dentro de la secuencia de la proteína mayoritaria de la cápside VP2 existen cerca de cinco diferencias aminoacídicas entre CPV-2 y las demás variantes antigénicas (tipos 2a, 2b y 2c), y cerca de dos entre las variantes mismas. Sin embargo, la clasificación de las variantes antigénicas se basa principalmente en la identidad del aminoácido presente en la posición 426 de la proteína de la cápside VP2. El aminoácido puede ser asparagina, o aspartato, o glutamato para las variantes antigénicas CPV-2a, CPV-2b, y CPV-2c, respectivamente (Martella *et al.*, 2006). Dicha diferencia genera un epítipo mayor o epítipo A típico de cada variante que es reconocido por paneles distintos de anticuerpos monoclonales específicos. No obstante, nosotros no utilizamos técnicas serológicas para tipificar las variantes de CPV-2, sino que se empleó la técnica PCR-RFLP. La misma permite establecer la presencia de glutamato en la posición 426 de la VP2, característico de la variante 2c, ya que el codón de dicho aminoácido es parte de un sitio de corte para la enzima de restricción *MboII* utilizada en el RFLP.

Durante el año 2006, nuestro laboratorio reportó 24 muestras tipo 2c y solamente una tipo 2a (Pérez *et al.*, 2007). Por lo tanto, aunque no existían estudios previos sobre los genotipos que circulaban anteriormente al año 2006 en el Uruguay, podríamos presumir que la variante CPV-2c estaba reemplazando completamente a otras variantes previas, entre las cuales posiblemente se encontraba la variante 2a detectada. Este resultado previo se ve confirmado con los datos presentados en esta tesina. Todas las muestras positivas aquí identificadas correspondieron a CPV-2c, lo cual sugiere que esta variante sería la única que actualmente se encuentra circulando en nuestro territorio. Uruguay se constituye en el único país del mundo donde la variante 2c alcanza una proporción del 100% (Fig. 18). Estos resultados nos están indicando que nuestro país puede ser considerado un paradigma de cómo una variante es capaz de surgir en una población y reemplazar totalmente a las anteriores variantes establecidas. Debido a que CPV-2c fue reportada por primera vez en Italia en el año 2000 (Buonavoglia *et al.*, 2006), la presencia de dicha variante en las muestras de canes uruguayos demuestra no sólo su alta capacidad de reemplazo sino también el corto tiempo que requirió para hacerlo. Este hecho se ve confirmado por el análisis de las frecuencias a nivel mundial (Fig. 18) donde se observa claramente que dicha variante se ha dispersado y alcanzado una importante prevalencia en todos los continentes, excepto Oceanía.

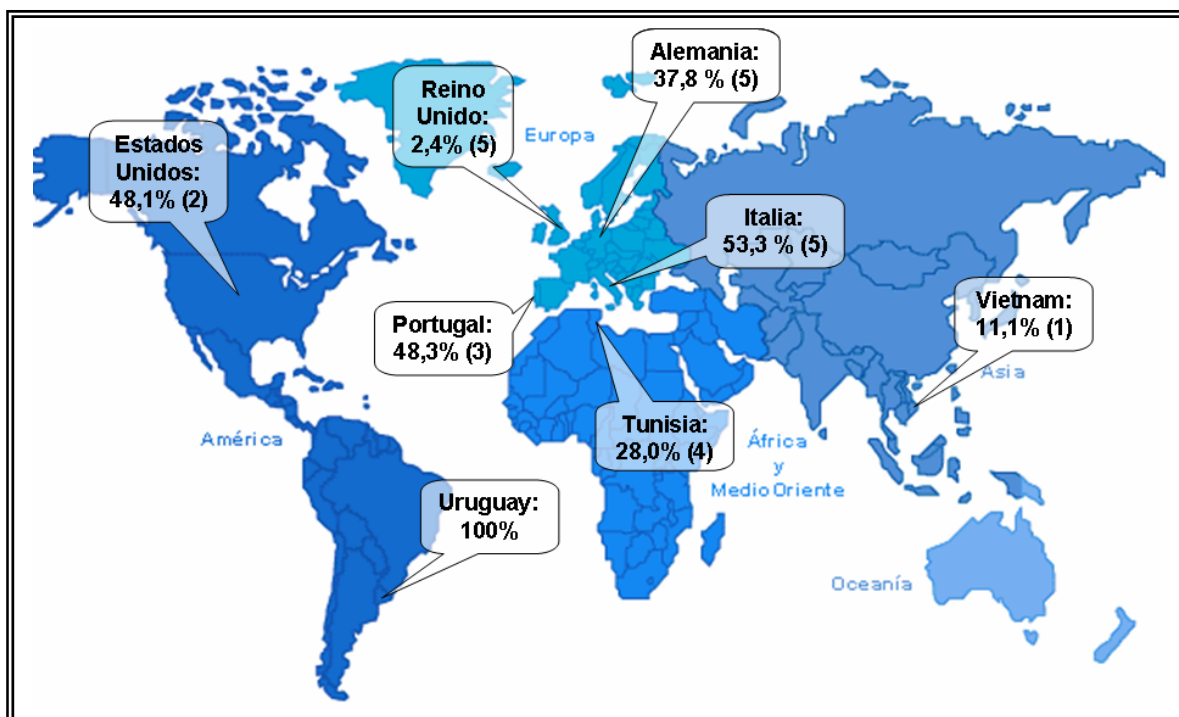


Figura 18. Porcentajes observados de CPV-2c en los países donde fue detectada y analizada su frecuencia. Referencias: (1) Nakamura *et al.*, 2004; (2) Kapil *et al.*, 2007; (3) Viera *et al.*, 2008; (4) Touihri *et al.*, 2008; (5) Decaro *et al.*, 2007.

La caracterización de las variantes circulantes en un determinado territorio no sólo tiene importancia para el estudio evolutivo del virus, sino también para el estudio del impacto que tiene la vacunación, la producción de vacunas, el esquema de vacunación y las estrategias de control a ser seguidas, así como para estudiar su virulencia y epidemiología. Usualmente los países en vías de desarrollo que no cuentan con datos de las variantes circulantes en su territorio, se ven obligados a extrapolar la información de países que sí han caracterizado sus genotipos, consecuentemente, muchas veces las vacunas a la que se recurre pueden no ser efectivas contra la variante circulante en el país. Las cepas vacunales poseen determinados antígenos que son reconocidos por anticuerpos específicos. Por esta razón, si los canes son inmunizados con vacunas que no contienen las variantes circulantes de la región, es posible que los mismos no estén adecuadamente protegidos. Debido a que algunos de los canes infectados con CPV-2c en el presente estudio habían sido inmunizados, podemos suponer que las vacunas utilizadas actualmente en nuestro territorio, que no contienen la variante 2c, son ineficientes en cuanto a la protección contra la enfermedad. No obstante, no se puede descartar la posibilidad de que la falla de la vacunación se deba a su administración incorrecta, y no porque la cepa vacunal no proporcione protección contra la enfermedad. Esto puede ocurrir si, por ejemplo, se vacuna a los cachorros cuando aún poseen anticuerpos anti-CPV-2 adquiridos pasivamente a través de la madre, los cuales pueden unirse a los antígenos virales vacunales y prevenir o disminuir la respuesta inmune que debería producirse. Por otro lado, podemos hipotetizar que la falla de la vacunación pueda deberse a que los animales hayan sido infectados con el virus poco tiempo antes de la vacunación, de manera que no hayan podido desarrollar inmunidad a tiempo que proteja contra la enfermedad. Desafortunadamente no contamos con información que pueda esclarecer estas dudas y que demuestren si las vacunas que se usan actualmente en nuestro país ofrecen, o no, protección contra la cepa CPV-2c. Varios trabajos presentados en otros países han planteado la necesidad de desarrollar vacunas que contengan las variantes que circulan actualmente en la población canina (Cavalli *et al.*, 2008; Decaro *et al.*, 2008). No obstante, otros trabajos indican que las vacunas basadas en la cepa CPV-2 original y las variantes CPV-2a y CPV-2b utilizadas hoy en día son efectivas contra la nueva variante CPV-2c (Spibey *et al.*, 2008). Lo claro es que se necesitarán estudios más exhaustivos de reactividad cruzada de las vacunas vigentes con las variantes que actualmente circulan para esclarecer esta disyuntiva.

Como se indicó previamente, los numerosos estudios evolutivos en CPV-2 que se han llevado a cabo indican que el virus ha evolucionado por la adquisición y fijación de mutaciones puntuales, fundamentalmente en los genes de las proteínas de la cápside (Hoelzer *et al.*, 2008). No obstante, en el presente trabajo planteamos otro tipo de evolución a la que

estaría también sometido CPV-2, que implicaría variación en el número de repeticiones en el genoma viral. Como se describió en la introducción, la cepa de referencia de CPV-2 (M19296) que data del año 1988, presenta dos grupos de repeticiones hacia el extremo 5' del genoma parvoviral (Reed *et al.*, 1988) (Fig. 3). El primero compuesto por dos monómeros de repetición, de 61 y 62 nucleótidos, respectivamente. El segundo grupo de repetidos está compuesto por tres monómeros de secuencia diferente al primer grupo, y constan de 62 nucleótidos cada uno. En el primer grupo de repetidos los análisis de las secuencias parvovirales de los últimos años muestran una tendencia evolutiva a la pérdida de un monómero de repetición (Maya *et al.*, en preparación). De acuerdo a nuestros resultados, el segundo grupo de repetidos también ha sido sometido a determinado nivel de variabilidad. Las muestras clonadas y secuenciadas en el presente estudio presentaron un sólo monómero de repetición del primer grupo de repetidos (resultado no mostrado en el presente estudio) y solamente un monómero de repetición en el segundo grupo de repetidos. Asimismo, se demostró mediante PCR/electroforesis que las cepas vacunales CPV-2a (Vplus5) y CPV-2b (DA₂PPVL) presentaban un sólo monómero de repetición al igual que las muestras en estudio (Fig. 12), y que la cepa vacunal CPV-2 (PDog), que corresponde a la cepa de referencia M19296, presentaba un fragmento de mayor tamaño que correspondería a los tres monómeros antes descritos (Fig. 11).

Mediante la aplicación del BlastN, utilizando un monómero de repetición del segundo grupo, se obtuvieron 21 secuencias que contenían dicho monómero. Dichas secuencias comprendidas entre los años 1984 y 2007, y pertenecientes a distintos países correspondieron a distintos virus del género *Parvovirus* como el Virus de la panleukopenia felina (FPLV), el Virus de la enteritis del visón (MEV), el Parvovirus del mapache (RPV), y el Parvovirus canino (CPV-2). Todas las secuencias, a excepción de la M19296 y la M10824, poseen un único monómero de repetición. Al igual que el monómero de las muestras clonadas, el mismo correspondería al último de los monómeros de M19296. Esto se sustenta por la presencia de una T en la novena posición del monómero (Fig. 17, flecha) que también se halla presente en el tercer monómero de la secuencia M19296.

Solamente la secuencia de FPLV con número de acceso M10824 en la base de datos GenBank presentó un monómero casi completo (con la última base deletada) y un segundo monómero con delección de los 10 nucleótidos iniciales. La presencia de la T anteriormente descrita (Fig. 17, flecha) en la primera unidad de repetición sugiere que ésta corresponde al tercer monómero de M19296, y que la segunda unidad incompleta podría haberse originado por duplicación de la primera. Esto se ve sustentado por la presencia de un cambio específico

(G en la posición 54) que se halla conservado entre ambos monómeros sugiriendo su origen común.

Por otro lado, es llamativa la presencia única entre todas las secuencias de una G (Fig. 17, estrella) en la octava posición del monómero de la variante CPV-2a (M6). Este cambio no se halló en ninguna de las cepas 2c analizadas, ni tampoco en secuencias tipo 2a tomadas del GenBank. Sin embargo, estas últimas provenían de Estados Unidos y China, por lo que podemos suponer que la transición A→G, constituye un cambio característico que se halla presente sólo en algunas cepas sudamericanas. Esto podría estar indicando que la variante 2c y las 2a uruguayas tienen diferencias que involucran más que el aminoácido 426, sustentando un posible origen distinto.

El hecho de que exista solamente una secuencia que posee los tres monómeros de repetición es llamativo, y debido a que dicha secuencia pertenece a una cepa vacunal podríamos plantearnos la hipótesis de que la presencia de un mayor número de repetidos podría ser resultado de la atenuación a la que fue sometida la cepa. No obstante, otras cepas vacunales (Fig. 12), las cuales también fueron sometidas a atenuación, poseían solamente un monómero de repetición, por lo cual sospechamos que no existe una relación directa entre ambos fenómenos. Adicionalmente, muchas de las secuencias del presente estudio obtenidas de la base de datos GenBank fueron sometidas a pasajes en cultivos celulares por lo cual también sufrieron, en menor medida, un proceso de atenuación. Este hecho, junto con la observación previa de la variación en el primer grupo de repetidos, sugiere que realmente existe en la naturaleza un proceso de variación en el segundo grupo de repetidos. Es notorio que existen cepas con un solo monómero que son de años anteriores a la cepa vacunal con tres monómeros (i.e. M10989 del año 1984). Este hecho parece estar indicando que la ganancia o pérdida de monómeros en el segundo grupo de repetidos no sigue una tendencia evolutiva (i.e. de cepas antiguas a modernas), sino que debería ser considerado como un mecanismo extra de variabilidad viral poco común que podría conducir en el futuro a la aparición de cepas con nuevos reordenamientos en esta región particular del genoma. Se debe considerar que aunque este mecanismo de variabilidad sea poco común, los altos niveles de replicación viral incrementan su probabilidad de ocurrencia. Estudios en MVM estiman que ocurren 5×10^2 eventos de delección por célula durante el ciclo infeccioso viral de 48 horas, lo que representa un asombroso alto nivel de mutaciones comparado con la tasa de delección espontánea de 10^{-5} observada en el gen *lacI* de *E. coli* (Hogan & Faust, 1984). La extremadamente alta tasa de delecciones podría ser el resultado de los mecanismos de replicación del DNA parvoviral, que consiste en un mecanismo de desplazamiento de hebra unidireccional. Alternativamente, las proteínas virales podrían influenciar el proceso de delección alterando la tasa de deslices de la

DNA polimerasa celular durante la replicación del genoma viral o, a través de la inducción de altos niveles de enzimas celulares que normalmente catalizan dicho proceso (Hogan & Faust, 1984).

Aún no se ha designado ninguna función concreta a estos repetidos, no obstante, se ha sugerido que algunas secuencias repetidas en MVM tienen similitudes con secuencias potenciadoras de la transcripción (Parrish *et al.*, 1988). Por otro lado, algunos autores sugieren que las secuencias repetidas podrían ejercer una función pasiva en el ajuste del largo del DNA a fin de obtener un tamaño óptimo para su empaquetamiento en la respectiva cápside (Rhode, 1985). Según esta hipótesis, para que se mantenga el tamaño del genoma viral, nuevas secuencias deberían estar duplicándose o insertándose en otras regiones del genoma viral en las cepas que han perdido monómeros de repetición.

Nuestra observación del alto nivel de conservación del monómero de repetido sustenta la funcionalidad del mismo. Solamente se observaron dos variaciones en 62 bases. En teoría se esperaría mayor variación ya que se trata de una región no codificante del genoma viral, la que hipotéticamente estaría sujeta a menores presiones selectivas. A esto se suma el hecho de que los parvovirus de carnívoros presentan una alta tasa de sustitución nucleotídica más semejante a las de virus RNA que a las de otros virus DNA (Shackelton *et al.*, 2005). Sin embargo, son necesarios estudios más profundos sobre estas secuencias repetidas con el fin de dilucidar su funcionalidad, si es que efectivamente presentan alguna además de la generación de variabilidad viral.

Por último es importante destacar que el alto nivel de conservación del monómero analizado en este trabajo, sugiere su posible utilización en técnicas de diagnóstico, como por ejemplo, el desarrollo de una sonda Taqman para rt-PCR que hibride dentro del mismo. No obstante, son pocas las secuencias del mismo presentes en las bases de datos por lo que no se puede realizar un análisis más exhaustivo de la variabilidad del mismo, y determinar si efectivamente puede ser utilizado con dicho fin.

7. CONCLUSIONES

La detección del virus en muchas de las muestras analizadas indica que la mayoría de los casos de gastroenteritis hemorrágica en cachorros es causada por el CPV-2.

La caracterización de CPV-2c en todas las muestras positivas analizadas sugiere que esta variante podría ser la única circulante actualmente en nuestro país.

Los resultados obtenidos en el presente estudio sugieren que la variante 2c tiene una gran capacidad de reemplazo en un tiempo relativamente corto.

Todas las muestras analizadas presentaron un único monómero de repetición en el segundo grupo de repetidos. El bajo nivel de variación dentro de los mismos sugiere su importancia y reafirma la hipótesis de alguna posible funcionalidad.

Los estudios comparativos de la secuencia y el número de monómeros en el segundo grupo de repetidos sugieren que su variación representa un mecanismo poco común de variabilidad del virus.

8. PERSPECTIVAS FUTURAS

Como objetivo fundamental en el laboratorio nos proponemos continuar con el diagnóstico y la caracterización de muestras en los años siguientes con el fin de colaborar en el control de la enfermedad y analizar la evolución viral. Asimismo, intentaremos analizar cepas antiguas de canes presuntamente infectados. Estas cepas se obtendrán de tejidos incluidos en bloques de parafina (del año 2000 al 2005) que serán amablemente cedidos por la Facultad de Veterinaria. De esta forma, podremos dilucidar el camino evolutivo que fue recorrido por CPV en nuestro territorio y determinar cuales fueron las variantes que circulaban en Uruguay. Este estudio también nos permitirá determinar si la variante CPV-2c circulante en nuestro país fue importada de otras regiones del mundo o si surgió *de novo* a partir de una variante que circulaba anteriormente.

También se intentará obtener la secuencia completa del genoma viral, incluyendo las regiones codificantes, y no codificantes. Para ello, se están secuenciando la totalidad de los genes virales así como se están poniendo a punto técnicas que permitan la amplificación de los extremos del genoma parvoviral.

Por otro lado, pretendemos continuar con el análisis del monómero de repetición a fin de determinar si el mismo puede ser utilizado para desarrollarse una sonda de hibridación para diagnóstico de CPV-2 por rt-PCR.

El Departamento de Inmunología de la Facultad de Veterinaria, en conjunto con nuestro laboratorio pretende cultivar el virus con el objetivo de desarrollar kits comerciales de ELISA para diagnóstico de CPV-2, así como también para la realización de ensayos de inmunidad cruzada entre las vacunas que se comercializan actualmente en nuestro país y las cepas de campo que circulan en el presente en el territorio uruguayo.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- **Agbandje M., Parrish C. & Rossmann M. (1995).** The structure of parvovirus. *Semin Virol* **6**, 299-30.
- **Appel M., Cooper B., Greisen H. & Carmichael L. (1978).** Status Report: Canine Viral Enteritis. *J Am Vet Med Assoc* **173**, 1516-1518.
- **Appel M., Cooper B., Greissen H., Scott F. & Carmichael L. (1979a).** Canine viral enteritis. I. Status report on corona- and parvo-like viral enteritides. *Cornell Vet* **69**, 123-133.
- **Appel M., Scott F. & Carmichael L. (1979b).** Isolation and immunisation studies of a canine parvo-like virus from dogs with haemorrhagic enteritis. *Vet Rec* **105**, 156-159.
- **Barbis D., Chang S. & Parrish C. (1992).** Mutations adjacent to the dimple of the Canine parvovirus capsid structure affect sialic acid binding. *Virology* **191**, 301-308.
- **Battilani M., Scagliarini A., Tisato E., Turilli C., Jacoboni I., Casadio R. & Prospero S. (2001).** Analysis of Canine parvovirus sequences from wolves and dogs isolated in Italy. *J Gen Virol* **82**, 1555-1560.
- **Battilani M., Ciulli S., Tisato E. & Prospero S. (2002).** Genetic analysis of Canine parvovirus isolates (CPV-2) from dogs in Italy. *Virus Res* **83**, 149-157.
- **Berns K. (1990).** Parvovirus replication. *Microbiol rev* **54**, 316-329.
- **Buonavoglia C., Martella V., Pratelli A., Tempesta M., Cavalli A., Buonavoglia D., Bozzo G., Elia G., Decaro N. & Carmichael L. (2001).** Evidence for evolution of Canine parvovirus type 2 in Italy. *J Gen Virol* **82**, 3021-3025.
- **Cater J. & Pintel D. (1992).** The small non-structural protein NS2 of the autonomous parvovirus minute virus of mice is required for virus growth in murine cells. *J Gen Virol* **73**, 1839-1843.
- **Cavalli A., Bozzo G., Decaro N., Tinelli A., Aliberti A. & Buonavoglia D. (2001).** Characterization of Canine parvovirus strain isolated from an adult dog. *New Microbiol* **24**, 239-242.
- **Cavalli A., Martella V., Desario C., Camero M., Bellacicco A., De Palo P., Decaro N., Elia G. & Buonavoglia C. (2008).** Evaluation of the antigenic relationships among Canine parvovirus type 2 variants *Clin Vaccine Immunol.* **15**, 534-539.
- **Chinchkar S., Mohana Subramanian B., Hanumantha Rao N., Rangarajan P., Thiagarajan D. & Srinivasan V. (2006).** Analysis of VP2 gene sequences of Canine parvovirus isolates in India. *Arch Virol* **151**, 1881-1887.

- **Chiorini J., Wiener S., Yang L., Smith R., Safer B., Kilcoin N., Liu Y., Urcelay E. & Kotin R. (1996).** The roles of AAV Rep proteins in gene expression and targeted integration. *Curr Top Microbiol Immunol* **218**, 25-33.
- **Cotmore S. & Tattersall P. (2003).** Resolution of parvovirus dimer junctions proceeds through a novel heterocruciform intermediate. *J Virol* **77**, 6245-6254.
- **Daeffler L., Horlein R., Rommelaere J. & Nuesch J. (2003).** Modulation of minute virus of mice cytotoxic activities through site-directed mutagenesis within the NS coding region. *J Virol* **77**, 12466-12478.
- **Decaro N., Elia G., Martella V., Desario C., Campolo M., Di Trani L., Tarsitano E., Tempesta M. & Buonavoglia C. (2005).** A real-time PCR assay for rapid detection and quantitation of Canine parvovirus type 2 DNA in the feces of dogs. *Vet Microbiol* **105**, 19-28.
- **Decaro N., Martella V., Desario C., Bellacicco A., Camero M., Manna L., d'Aloja D. & Buonavoglia C. (2006).** First detection of Canine parvovirus type 2c in pups with haemorrhagic enteritis in Spain. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* **53**, 468-472.
- **Decaro N., Desario C., Addie D., Martella V., Viera M., Elia G., Zicola A., Davis C., Thompson G., Thiry E., Truyen U. & Buonavoglia C. (2007).** The study molecular epidemiology of Canine parvovirus, Europe. *Emerg Infect Dis* **13**, 1222-1224.
- **Decaro N., Desario C., Elia G., Martella V., Mari V., Lavazza A., Nardi M. & Buonavoglia C. (2008).** Evidence for immunisation failure in vaccinated adult dogs injected with Canine parvovirus type 2c. *New Microbiol* **31**, 125-130.
- **Desario C., Decaro N., Campolo M., Cavalli A., Cirone F., Elia G., Martella V., Lorusso E., Camero M. & Buonavoglia C. (2005).** Canine parvovirus infection: Which diagnostic test for virus?. *J Virol Methods* **126**, 179-185.
- **Fields B., Knipe D., Howley P., Griffin D., Lamb R., Martin M., Roizman B. & Straus S. (Editors) (2006).** *Virology*, 5th edn. Lippincott Williams & Wilkins Publishers, Philadelphia, Pa.
- **Hoelzer K., Shackelton L., Parrish C. & Holmes E. (2008).** Phylogenetic analysis reveals the emergence, evolution and dispersal of carnivore parvoviruses. *J Gen Virol* **89**, 2280-2289.
- **Hong C., Decaro N., Desario C., Tanner P., Pardo M., Sanchez S., Buonavoglia C. & Saliki J. (2007).** Occurrence of Canine parvovirus type 2c in the United States. *J Vet Diagn Invest* **19**, 535-539.
- **Hueffer K., Parker J., Weichert W., Geisel R., Sgro J. & Parrish C. (2003).** The natural host range shift and subsequent evolution of Canine parvovirus resulted from virus-specific binding to the canine transferrin receptor. *J Virol* **77**, 1718-1726.

- **Ikeda Y., Mochizuki M., Naito R., Nakamura K., Miyazawa T., Mikami T. & Takahashi E. (2000).** Predominance of Canine parvovirus (CPV) in unvaccinated cat populations and emergence of new antigenic types of CPVs in cats. *Virology* **278**, 13-19.
- **Kapil S., Cooper E., Lamm C., Murray B., Rezabek G., Johnston L 3rd., Campbell G. & Johnson B. (2007).** Canine parvovirus types 2c and 2b circulating in North American dogs in 2006 and 2007. *J Clin Microbiol* **45**, 4044-4407.
- **Koptopoulos G., Papadopoulos O., Papanastasopoulou M. & Cornwell J. (1986).** Presence of antibody cross-reacting with Canine parvovirus in the sera of dogs from Greece. *Vet Rec* **118**, 332-333.
- **Martella V., Decaro N. & Buonavoglia C. (2006).** Evolution of CPV-2 and impicance for antigenic/genetic characterization. *Virus Genes* **33**, 11-13.
- **Miller C. & Pintel D. (2002).** Interaction between parvovirus NS2 protein and nuclear export factor Crm1 is important for viral egress from the nucleus of murine cells. *J Mol Biol* **247**, 3257-3266
- **Nakamura M., Tohya Y., Miyazawa T., Mochizuki M., Phung H., Nguyen N., Huynh L., Nguyen L., Nguyen P., Nguyen P., Nguyen N. & Akashi H. (2004).** A novel antigenic variant of Canine parvovirus from a vietnamese dog. *Arch Virol* **149**, 2261-2269.
- **Nuesch J., Dettwiler S., Corbau R. & Rommelaere J. (1998).** Replicative functions of minute virus of mice NS1 protein are regulated in vitro by phosphorylation through portin kinase C. *J Virol* **72**, 9966-9977.
- **Parrish C., Aquadro C. & Carmichael L. (1988).** Canine host range and a specific epitope map along with variant sequences in the capsid protein gene of Canine parvovirus and related Feline, Mink, and Raccoon parvoviruses. *Virol* **166**, 293-307.
- **Parrish C., Aquadro C., Strassheim M., Evermann J., Sgro J. & Mohammed H. (1991).** Rapid antigenic-type replacement and DNA sequence evolution of Canine parvovirus. *J Virol* **65**, 6544-6552.
- **Parrish C. & Kawaoka Y. (2005).** The origins of new pandemic viruses: The acquisition of new host range by Canine parvovirus and Influenza A viruses. *Annu Rev Microbiol* **59**, 553-586.
- **Pérez R., Francia L., Romero V., Maya L., López I. & Hernández M. (2007).** First detection of Canine parvovirus type 2c in South America. *Vet Microbiol* **19**, 535-539.
- **Pollock R. (1982).** Experimental Canine parvovirus infection in dogs. *Cornell Vet* **72**, 103-119.
- **Reed A., Jones E. & Miller T. (1988).** Nucleotide sequence and genome organization of Canine parvovirus. *J Virol* **62**, 299-276.

- **Rhode S. (1985).** Nucleotide sequence of the coat protein gene of Canine parvovirus. *J Virol* **54**, 630-633.
- **Robinson W., Wilcox G., Flower R. & Smith J. (1979).** Evidence for a parvovirus as the etiologic agent in the myocarditis of puppies. *Aust Vet J* **55**, 294-295.
- **Robinson W., Wilcox G. & Flower R. (1980).** Canine parvovirus disease: experimental reproduction of the enteric form with a parvovirus isolated from a case of myocarditis. *Vet Pathol* **17**, 589-599.
- **Roseto A., Lema F., Cavalieri F., Dianoux L., Sitbon M., Ferchal F., Lasneret J. & Peries J. (1980).** Electron microscopy detection and characterization of viral particles in dog stools. *Arch Virol* **66**, 89 - 93.
- **Sambrook J., Fritsch E. & Maniatis T. (1989).** Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- **Schunck B., Kraft W. & Truyen U. (1995).** A simple touch-down polymerase chain reaction for the detection of Canine parvovirus and Feline panleukopenia virus in feces. *J Virol Methods* **55**, 427-433.
- **Schwens A., Pastoret P., Burtonboy G. & Thiry E. (1979).** Frequence en Belgique de l'observation des premiers cas cliniques. *Ann Med Vet* **123**, 561-566.
- **Shackelton L., Parrish C., Truyen U. & Holmes E. (2005).** High rate of viral evolution associated with the emergence of carnivore parvovirus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 379-384.
- **Skikne B. (1998).** Circulating Transferrin Receptor assay-coming of age. *Clin Chem* **44**, 7-9.
- **Spibey N., Greenwood I., Tarpey S., Chalmers D. & Sutton A. (2006).** Canine parvovirus type 2 vaccine protects dogs following challenge with a recent type 2c strain, p. 885-886. *In Proceedings of the 31st World Small Animal Veterinary Congress, 11 to 14 October 2006, Prague, Czech Republic.*
- **Spitzer A, Parrish C. & Maxwell I. (1997).** Tropic determinant for Canine parvovirus and Feline panleukopenia virus functions through the capsid protein VP2. *J Gen Virol* **78**, 925-928.
- **Steinel A., Munson L., Van Vuuren M. & Truyen U. (2000).** Genetic characterization of Feline parvovirus sequences from various carnivores. *J Gen Virol* **81**, 345-350.
- **Touihri L., Bouzid I., Daoud R., Desario C., El Goulli A., Decaro N., Ghorbel A., Buonavoglia C. & Bahloul C. (2009).** Molecular characterization of Canine parvovirus-2 variants circulating in Tunisia. *Virus Genes* **38**, 249-258.

- **Truyen U., Evermann J., Vieler E. & Parrish C. (1996).** Evolution of Canine parvovirus involved loss and gain of feline host range. *Virology* **215**, 186-189.
- **Truyen U., Geissler K., Parrish C., Hermanns W. & Siegl G. (1998).** No evidence for a role of modified live virus vaccines in the emergence of Canine parvovirus. *J Gen Virol* **79**, 1153-1158.
- **Truyen U. (1999).** Emergence and recent evolution of Canine parvovirus. *Vet Microbiol* **69**, 47-50.
- **Truyen U. (2000).** Canine parvovirus. In: Carmichael L. (Ed.), *Recent Advances in Canine Infectious Diseases*. Ithaca: International Veterinary Information Service (www.ivis.org); Document No. A0106.0100.
- **Tsao J., Chapman M., Agbandje M., Keller W., Smith K., Wu H., Luo M., Smith T., Rossmann M., Compans R. & Parrish C. (1991).** The three-dimensional structure of Canine parvovirus and its functional implications. *Science* **251**, 1456-1464.
- **Vihinen-Ranta M., Suikkanen S. & Parrish C. (2004).** Pathways of cell infection by parvoviruses and Adeno-Associated viruses. *J Virol* **78**, 6709-6714.
- **Wang D., Yuan W., Davis I. & Parrish C. (1998).** Nonstructural protein-2 and the replication of Canine parvovirus. *Virol* **240**, 273-281.

10. ANEXO I: PROTOCOLOS

10.1. Clonación con el kit “GeneJet PCR Product Cloning kit” de Fermentas:

- Reacción de blunting:
 1. Mezclar 10 μL de buffer 2X, 1-2 μL de producto de PCR, 1 μL de enzima DNA Blunting, y agua Nuclease-Free hasta completar un volumen final de 18 μL .
 2. Vortexear y spinear brevemente.
 3. Incubar a 70°C por 5 minutos.
 4. Enfriar en hielo por varios segundos.
- Reacción de ligación de los productos de PCR al vector PJET1/blunt:
 1. Agregar 1 μL de vector PJET1/blunt (50 ng/ μL).
 2. Agregar 1 μL de T4 DNA ligasa (50 U/ μL).
 3. Vortexear y spinear.
 4. Incubar a 22°C por 5 minutos.
- Transformación de células XL1 Blue competentes:
 1. Tomar 50 μL de células XL1Blue competentes e inocular 5 μL de ligación.
 2. Incubar en hielo por 15 minutos.
 3. Incubar en baño a 42°C por 45 segundos.
 4. Transferir rápidamente a hielo por 2 minutos.
 5. En un falcon agregar 300 μL de medio SOC.
 6. Incubar en agitador a 200 rpm por 1-1,5 horas a 37°C.
 7. Plaquear 100 μL por placa de LB agar ampicilina.
 8. Incubar la placa a 37°C toda la noche.

10.2. “Minipreps”, técnica fenol-cloroformo modificada de Sambrook:

1. Transferir 1.5 mL de medio de cultivo a un eppendorf y centrifugar a 12000 rpm durante 1 minuto.
2. Descartar el sobrenadante y repetir los pasos 1 y 2 hasta terminar el medio de cultivo.
3. Resuspender el pellet en 100 μL de solución I (solución de resuspensión) (EDTA 0.25M, Tris 1M) y vortexear bien.
4. Agregar 200 μL de solución II (solución de lisis) (NaOH 10N, SDS 10%) recién preparada en cada eppendorf, agitar por inversión 5 veces y colocar en hielo (para inhibir la actividad de DNAsas).

5. Agregar 150 μL de solución III (solución de neutralización) (Acetato de Potasio 5M y Ácido acético glacial), invertir durante 10 segundos y dejar en hielo de 3 a 5 minutos.
6. Centrifugar durante 5 minutos a 12000 rpm y transferir el sobrenadante a un nuevo eppendorf.
7. Agregar 2 μL cada 50 μL de sobrenadante de RNAsa A/T1 Mix (2 mg/mL y 5000 U/mL respectivamente) e incubar durante 30 minutos a 55°C.
8. Realizar dos extracciones consecutivas con 400 μL de fenol:cloroformo:isoamil y centrifugar durante 5 minutos. Recuperar la fase superior y transferirla a un nuevo eppendorf.
9. Realizar una extracción con 400 μL de cloroformo y centrifugar por 5 minutos. Recuperar la fase superior y transferirla a un nuevo eppendorf.
10. Precipitar el ADN agregando dos volúmenes de etanol absoluto frío y 0.1 volúmenes de acetato de sodio, agitar vigorosamente y dejar a -20°C toda la noche.
11. Centrifugar durante 30 minutos a 12000 rpm y descartar el sobrenadante.
12. Lavar las sales del pellet de DNA plasmídico agregando 500 μL de etanol 70% frío (4°C) y centrifugar por 5 minutos.
13. Descartar el sobrenadante y dejar secar el pellet con el eppendorf abierto hasta evaporar las trazas de etanol (puede secarse en estufa a 55°C durante 5 minutos).
14. Resuspender el DNA en un volumen adecuado de agua (generalmente en 30 μL) y guardar a -20°C.

11. AGRADECIMIENTOS

A Ruben Pérez, por su paciencia y disposición en todo momento, por todos los conocimientos y enseñanzas brindados.

A toda la Sección Genética Evolutiva, especialmente a Valeria Romero y Leticia Maya, por las innumerables ayudas que nos han brindado a todos en el laboratorio.

A Ricardo Recarey y Leandro Giuliani, por todos los momentos compartidos, por el apoyo y el cariño.

A Santiago Quevedo, por su paciencia y cariño, por su apoyo incondicional en todo momento, y por la comprensión y contención que supo brindarme a diario, es a él a quien afectuosamente dedico este trabajo.