



Tesis de Grado en Bioquímica
Subárea Virología



VARIABILIDAD GENÉTICA DE HANTAVIRUS CAUSANTES DE SÍNDROME PULMONAR EN URUGUAY.



Patricia Dini

Orientador: Dra. Adriana Delfraro

Facultad de Ciencias, Universidad de la República

Montevideo, 2014

Agradecimientos

A mi familia, los cuales han sido un pilar fundamental en mi vida, apoyándome siempre, especialmente en este camino tan importante para mí. A mi amor, por estar a mi lado en todo momento y ayudarme a seguir adelante en las instancias difíciles.

A mi amiga y compañera de carrera Lucía Malta, que estuvo junto a mí en cada curso, en cada examen, brindándome siempre su positividad y alegría de manera incondicional. Gracias por esas horas de estudio que finalmente se convertían en charla.

A todas las personas que compartieron conmigo algún momento de este maravilloso camino, que se hicieron sentir y dejaron su huella en él.

A Adriana, por permitirme entrar en el mundo de la virología, mi gran pasión. A los integrantes del laboratorio por la buena onda de siempre. Quiero agradecer especialmente a Andrés Cabrera quién dedicó muchas horas de su tiempo a ayudarme y aconsejarme, y quién me apoyó durante todo el proyecto.

A la ANII por otorgarme una beca de iniciación, y a la CSIC por la financiación del proyecto.

Resumen

Los hantavirus (*Bunyaviridae*) son agentes zoonóticos cuyos principales reservorios naturales son mamíferos de los órdenes Rodentia y Soricomopha. La transmisión ocurre mediante aerosoles generados por las excretas de animales infectados. La infección en humanos es incidental, a través de la inhalación de partículas virales existentes en los aerosoles provenientes de roedores. En las Américas, la enfermedad causada por estos virus se denomina síndrome pulmonar por hantavirus (SPH).

En Uruguay la mayoría de los casos de hantaviriosis ocurren al Sur del Río Negro, en especial en Montevideo, Canelones, Colonia, San José, Soriano y Rocha. En 2009 se reportó el primer caso en el norte de Uruguay (Artigas) y en 2014 se confirma el primer caso en Paysandú.

El objetivo de este trabajo es estudiar la variabilidad genética de hantavirus causantes de SPH en Uruguay. Para ello se utilizó ARN total obtenido de muestras seropositivas para SPH (2006 – 2013), diagnosticadas en el Departamento de Laboratorios del MSP. Con el fin de obtener la secuencia completa del segmento S del genoma viral (aproximadamente 1800 pares de bases), se pusieron a punto 9 reacciones de RT – PCR anidadas solapantes. Las secuencias obtenidas se ensamblaron, editaron y alinearon con secuencias disponibles en GenBank. Se obtuvo la secuencia completa de 11 muestras. Se realizaron análisis filogenéticos por máxima verosimilitud y búsqueda de recombinantes con el programa RDP v3. Se analizaron los porcentajes de homología y tasas de sustitución no sinónima/sinónima en la región codificante de la nucleoproteína. Los análisis mostraron que todas las muestras pertenecen al genotipo Lechiguanas/Central Plata, con elevados porcentajes de homología intragrupo (96,8%) y entre grupo con los genotipos Bermejo y Ñeembucu (91,7% y 90,1%, respectivamente). El conjunto de secuencias analizadas mostró una tasa de cambios no sinónimos vs sinónimos (dN/dS) global de 0,858, compatible con selección negativa. Se encontraron 7 sitios con selección fuertemente negativa y un único sitio sometido a selección positiva. Una de las cepas mostró evidencia de recombinación.

Los hantavirus son agentes causales de enfermedades graves y poseen un elevado índice de mortalidad, por lo que representan un creciente problema para la salud. Por sus características biológicas estos virus poseen gran plasticidad para introducir cambios en su genoma. El conocimiento de su variabilidad genética a través del tiempo es relevante, ya que aporta información útil para el diseño de políticas de prevención y control.

Agradecimientos	3
Resumen	4
I. Introducción.....	7
1. Familia Bunyaviridae	7
1.1. Definición	7
1.2. Género Hantavirus	7
1.2.1. Etapas de la replicación.....	8
1.2.1.1. Adsorción y entrada	8
1.2.1.2. Transcripción y traducción	8
1.2.1.3. Replicación genómica.....	8
1.2.1.4. Ensamblaje y liberación.....	9
1.2.2. Historia y localización geográfica	10
1.2.3. Síndrome pulmonar por hantavirus	12
1.2.4. Vías de transmisión	13
1.2.5. Factores de riesgo	13
1.2.6. Tratamiento.....	14
1.2.7. Prevención.....	14
1.2.8. Importancia del estudio	14
II. Objetivos.	15
2. Objetivo general.....	15
2.1. Objetivos específicos.....	15
III. Materiales y métodos.....	15
3. Procedimientos experimentales	15
3.1. Muestras empleadas	15
3.2. Diseño de primers	16
3.3. Puesta a punto de las RT-PCR anidadas	17
3.4. RT – PCR del segmento S de hantavirus.....	17
3.5. Electroforesis.....	19
3.6. Purificación y secuenciación	19
3.7. Análisis bioinformático.....	19
3.8. Análisis filogenético.....	19

3.9.	Análisis de recombinación.....	20
3.10.	Análisis de presiones selectivas	20
IV.	Resultados y discusión	20
4.	Resultados experimentales	20
4.1.	Amplificación de fragmentos	20
4.2.	Análisis bioinformático.....	22
4.3.	Análisis filogenético.....	23
4.4.	Análisis de recombinación.....	32
V.	Conclusiones.....	33
VI.	Perspectivas.....	33
	Referencias.	34
	Anexo	37
I.	Anexo I – Alineamiento nucleotídico	37
II.	Anexo II – Alineamiento aminoacídico.....	61

I. Introducción.

1. Familia *Bunyaviridae*

1.1. Definición

La familia *Bunyaviridae* se estableció como tal en el año 1975 para agrupar una gran cantidad de virus con propiedades morfológicas, morfogénicas y antigénicas similares.

Esta familia incluye más de 300 miembros serológicamente diferentes divididos en cinco géneros. Los géneros *Bunyavirus*, *Hantavirus*, *Nairovirus* y *Phlebovirus* comprenden virus capaces de infectar animales, mientras que los pertenecientes al género *Tospovirus* infectan más de 400 especies diferentes de plantas.

Mientras que la mayoría de los virus pertenecientes a esta familia son transmitidos por artrópodos, los hantavirus poseen como reservorio a mamíferos de los órdenes Rodentia y Soricomopha.^[1]

1.2. Género *Hantavirus*

Se trata de virus envueltos, generalmente esféricos de 80 – 120nm de diámetro, de genoma ARN simple hebra de polaridad negativa y cápside helicoidal. Consta de tres segmentos, el segmento L (large) el cual codifica para la ARN polimerasa, el segmento M (medium) que da lugar a glicoproteínas de superficie G_C y G_N , y el segmento S (small) que codifica la proteína de la nucleocápside (proteína N).^[2]

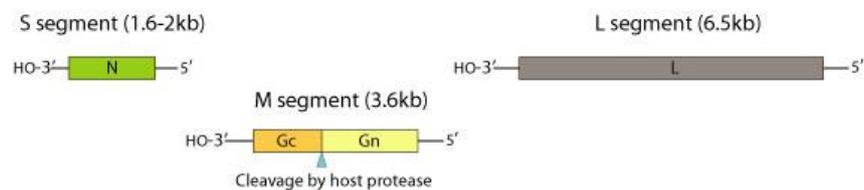


Figura 1. Segmentos del genoma ARN de Hantavirus.^[3]

Dentro del virión, los ARN genómicos forman un complejo con la proteína N para formar las ribonucleoproteínas (RNPs), las cuales se circularizan debido a la presencia de secuencias complementarias en los extremos 5' y 3' terminal de cada segmento genómico.^[4]

Los hantavirus carecen de proteína de matriz, es por ello que se cree que la proteína N es la encargada de mediar la interacción entre las RNPs y la cara interna de la envoltura viral.

En el exterior de la superficie viral se pueden observar proyecciones de aproximadamente 12nm que corresponden a las glicoproteínas, las cuales se extienden desde la bicapa lipídica hacia el exterior.^[2]



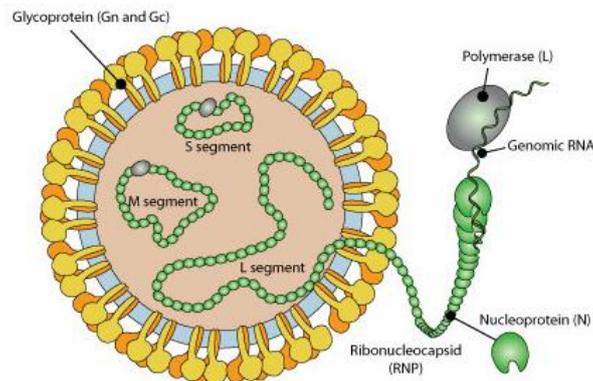


Figura 2. Estructura del virión.^[3]

1.2.1. Etapas de la replicación

1.2.1.1. Adsorción y entrada

Los hantavirus infectan células epiteliales, endoteliales, dendríticas foliculares, macrófagos, y linfocitos.^[2] Como en la mayoría de los virus envueltos, la adhesión a los receptores de la célula hospedera está mediada por las glicoproteínas que se encuentran en la envoltura viral. Las proteínas que actúan como receptores virales pertenecen a la familia de las integrinas. Una vez ocurrida la adsorción el virus entra a la célula por endocitosis en zonas de la superficie celular conocidas como depresiones recubiertas de clatrina. Los endosomas posteriormente se acidifican provocando la fusión de su membrana con la envoltura viral, haciendo que se libere la nucleocápside al citoplasma celular.^[1]

1.2.1.2. Transcripción y traducción

Luego del desnudamiento del genoma viral, se inicia la transcripción de los genes mediante la asociación de la proteína L con los tres segmentos de ARN viral.^[4]

El proceso de transcripción comienza mediante la acción de una endonucleasa asociada a la polimerasa viral que procesa los ARNm de la célula hospedera. Esta enzima corta el complejo cap existente en el extremo 5' de éstos para dar inicio a la síntesis de ARNm a partir del genoma viral. Mientras que la traducción de los segmentos L y S ocurre en ribosomas libres en el citoplasma, la traducción del segmento M se da en ribosomas asociados al retículo endoplasmático rugoso. Las glicoproteínas de superficie G_C y G_N forman heterodímeros que son transportados desde el retículo al aparato de Golgi donde completarán su glicosilación.^[1]

1.2.1.3. Replicación genómica

En virus con genomas de sentido negativo, el pasaje de transcripción primaria a replicación requiere el cambio de síntesis de ARNm a síntesis de ARNc de longitud completa y luego generación del ARNv.

La polimerasa debe en primer lugar funcionar como endonucleasa dependiente de cap para generar un “primer” para iniciar la síntesis de un transcripto de longitud subgenómica. En cierto punto, la polimerasa debe cambiar a un proceso de iniciación de la transcripción



independiente en el extremo 3' de la hebra y producir un transcripto de longitud completa, el cual será posteriormente encapsidado.^[1]

1.2.1.4. Ensamblaje y liberación

Para que ocurra el ensamblaje de las partículas virales se debe producir la interacción entre las ribonucleoproteínas y las proteínas virales de envoltura. Las primeras se encuentran en la cara citoplasmática de membranas vesiculares mientras que las proteínas virales se localizan como proteínas transmembrana principalmente en el lado luminal del aparato de Golgi. Esta interacción causa el brotamiento de las partículas virales en cisternas del Golgi. Finalmente los viriones son transportados en vesículas secretoras hacia la membrana plasmática para su liberación por exocitosis.^[1]

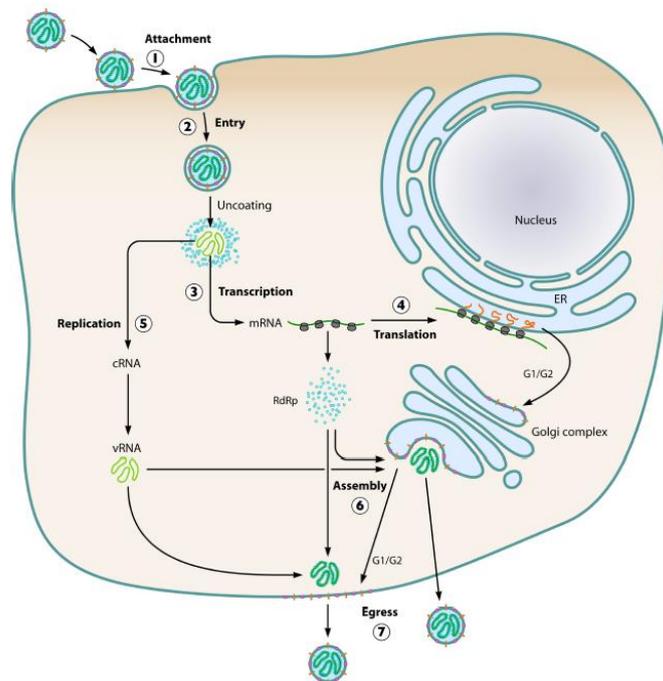


Figura 3. Ciclo viral de hantavirus.^[5]

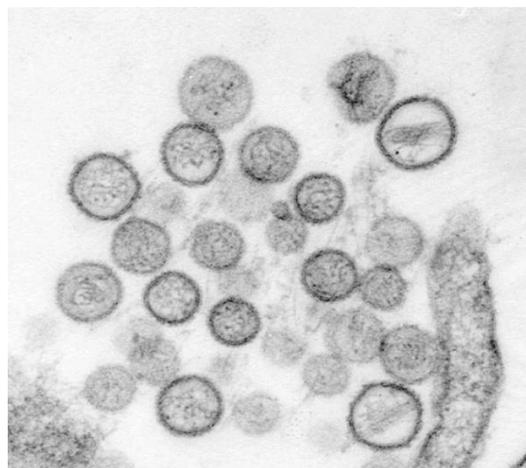


Figura 4. Micrografía electrónica del aislado del virus Sin Nombre, un agente causante del síndrome pulmonar por hantavirus (SPH).^[4]



Los hantavirus son causantes de dos clases de enfermedades: la fiebre hemorrágica con síndrome renal (FHSR) y el síndrome pulmonar por hantavirus (SPH).^[6]

1.2.2. Historia y localización geográfica

El primer brote de enfermedad causada por el virus tuvo lugar durante la guerra de Corea (1950 – 1953) donde más de 3000 soldados contrajeron la entonces denominada fiebre hemorrágica de Corea, llamada hoy en día fiebre hemorrágica con síndrome renal (FHSR). Se denominó con el nombre de hantavirus al agente causal de dicha enfermedad debido a su primer aislamiento cerca de la orilla del río Hantaan. Más adelante, en el año 1993, en la región de Four Corners en Estados Unidos se descubrió una nueva enfermedad causada por un virus de similares características pero genéticamente divergente; la misma se designó síndrome pulmonar por hantavirus (SPH).^[2]

Los Hantavirus se pueden agrupar en: Hantavirus del Viejo Mundo, autóctonos en Europa y Asia, y Hantavirus del Nuevo Mundo, originarios de América. Estos últimos tienen como reservorios a roedores de las subfamilias *Sigmodontinae*, *Arvicolinae* y *Neotominae* (familia *Cricetidae*).^[2,7]

Los Hantavirus del Viejo Mundo incluyen las especies *Hantaan*, *Puumala*, *Seoul*, y *Dobrava*. Estos son los causantes de la FHSR que afecta a aproximadamente 100.000 personas al año en estas partes del mundo.

Por otro lado, las especies pertenecientes a los Hantavirus del Nuevo Mundo son el virus *Sin Nombre*, *Prospect Hill*, *Bayou*, *Monongahela*, *Lechiguanas*, *Andes Central Plata*, *Laguna Negra*, *Araucaria*, *Juquitiba*, entre otros.

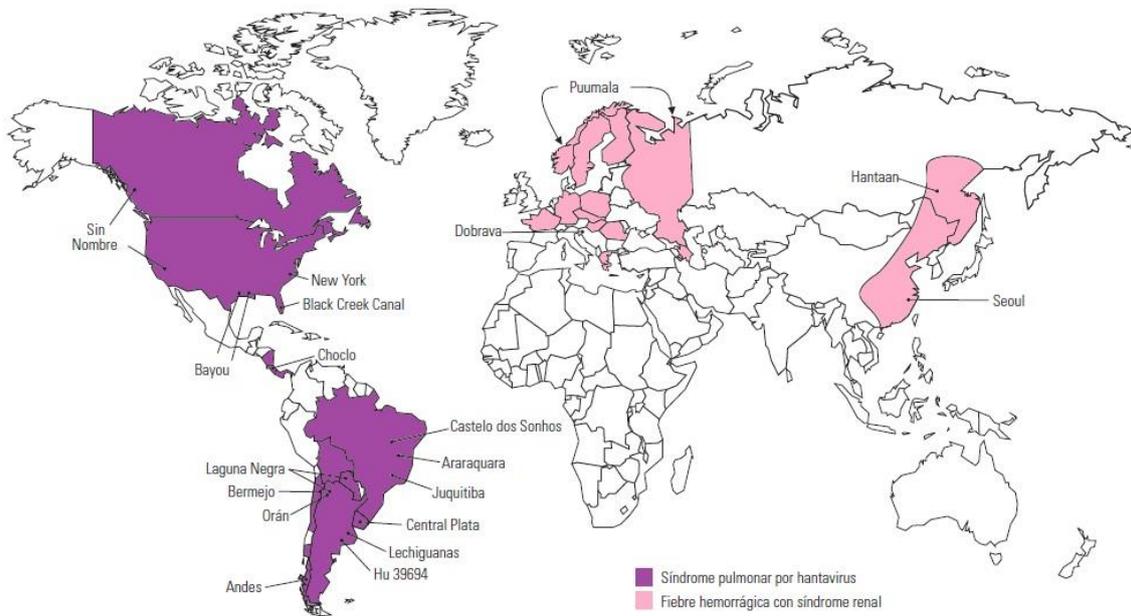


Figura 5. Distribución mundial de las especies de hantavirus y las enfermedades que éstas causan.^[8]



Desde 2007 se han identificado nuevos hantavirus asociados a mamíferos soricomorfos, los cuales hasta hoy no se han asociado a patología. Algunos ejemplos son Thottapalayam, Asama, Cao Bang, Imjim.^[9-11]

En Uruguay se evidenció por primera vez la circulación de Hantavirus mediante ensayos de inmunofluorescencia indirecta en muestras de donantes de sangre colectadas entre 1985 y 1987.^[12]

En 1997 se diagnosticaron los primeros casos de SPH en Uruguay, y en el 2000 se logró obtener las primeras secuencias parciales provenientes de alguno de éstos.^[12] En 2003 se determinó que uno de los principales reservorios de hantavirus en nuestro país es el ratón colilargo chico (*Oligoryzomys flavescens*); a partir de esto se pudieron caracterizar genéticamente los primeros virus autóctonos de roedores causantes de SPH.^[13] En el año 2005 se establecieron dos nuevos roedores como reservorios de hantavirus en Uruguay: el ratón colilargo grande (*Oligoryzomys nigripes*) y el ratón hocicudo (*Oxymycterus nasutus*).^[14-16]

Dentro del género Hantavirus se han identificado dos variantes circulantes en nuestro país: Jujutiba, transmitida por los roedores *O. nigripes* y *O. nasutus*, y Lechiguanas, presente en *O. flavescens*, siendo esta última la más abundante tanto en roedores como en SPH. Las últimas secuencias virales de SPH fueron reportadas en 2006.



Figura 6. Distribución geográfica del número de casos de síndrome pulmonar por hantavirus en Uruguay.^[17]



Tabla 1. Distribución de los casos confirmados de SPH en Uruguay. Se muestra la incidencia que posee cada uno de los departamentos.^[17]

Departamento	Casos de SPH confirmados	Incidencia / 100.000 hab.
Soriano	11	13,3
Rocha	9	13,2
Colonia	14	11,3
San José	12	11,0
Florida	5	7,4
Canelones	35	6,7
Montevideo	56	4,2
Flores	1	3,9
Maldonado	6	3,6
Durazno	2	3,5
Cerro Largo	2	2,3
Lavalleja	1	1,7
Artigas	1	1,3
Paysandú	1	0,8
Río Negro	0	0,0
Rivera	0	0,0
Salto	0	0,0
Treinta y Tres	0	0,0
Tacuarembó	0	0,0
Total	156	4,4

Nuestro país posee una región endémica localizada al sur del río Negro, en la cual se han reportado la mayoría de los casos de hantavirus. En cuanto a número absoluto de casos los departamentos más afectados son Montevideo, Canelones, Colonia, San José, Soriano y Rocha, siendo estos dos últimos los departamentos que presentan una mayor incidencia de la enfermedad. En 2009 se reportó el primer caso de SPH en el norte de Uruguay, en el departamento de Artigas,^[13,14,18] en 2014 se confirma el primer caso en Paysandú.

1.2.3. Síndrome pulmonar por hantavirus

El síndrome pulmonar por hantavirus (SPH) se caracteriza por causar síntomas iniciales como fiebre, dolores musculares, astenia, náuseas y dolor de cabeza. En algunos casos puede proseguir con infiltrados pulmonares intersticiales bilaterales, compromiso respiratorio e hipotensión, pudiendo desencadenar la muerte del individuo. Es necesaria la realización de una radiografía de tórax para evidenciar alteraciones en los pulmones del paciente. La infección por hantavirus tiene una letalidad de entre 30 – 50% dependiendo del tipo de virus causante de la infección así como del estado inmunológico del paciente.^[4,19,20] En Uruguay la letalidad promedio es de 33%, con una incidencia general de 4 casos por cada 100.000 habitantes.

En la figura 7 se muestra una placa de tórax realizada a un paciente con SPH. En la misma pueden observarse infiltrados intersticiales los cuales se visualizan como líneas radiodensas dentro del área pulmonar.





Figura 7. Radiografía de tórax de paciente con SPH. Observación de múltiples imágenes de tipo intersticial.^[21]

Los hallazgos de laboratorio clínicos típicos incluyen hemoconcentración (aumento en la viscosidad de la sangre), desplazamiento a la izquierda en el recuento de glóbulos blancos (aumento en el número), leucocitosis neutrofílica (aumento de la cantidad de neutrófilos en sangre), trombocitopenia (disminución de plaquetas) e inmunoblastos circulantes (infiltrado intersticial de células mononucleares agrandadas).

Existen tres criterios de diagnóstico de laboratorio: (1) la detección de inmunoglobulina M (IgM) específica para hantavirus o un aumento de cuatro veces en los títulos de inmunoglobulina G (IgG) específica para hantavirus en estudios serológicos por técnica de enzimo inmuno análisis (ELISA); (2) la detección de ARN viral mediante técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) en coágulo sanguíneo, suero u órganos; (3) detección de antígeno de hantavirus por inmunohistoquímica en órganos de autopsia.^[4]

1.2.4. Vías de transmisión

La transmisión de hantavirus se da de forma horizontal; ocurre mediante aerosoles generados por las excretas o saliva de animales infectados. Hasta el momento los únicos hantavirus patogénicos para el hombre son aquellos transmitidos por roedores. La infección en humanos es del tipo incidental, su contagio se da por medio de la inhalación de partículas virales existentes en los aerosoles provenientes de dichos roedores.^[2,7]

1.2.5. Factores de riesgo

Algunos factores antropogénicos como pueden ser la deforestación, el desarrollo agrícola y la urbanización, entre otros, han puesto en situación de riesgo a las poblaciones de animales domésticos y humanos frente a muchas enfermedades transmitidas por vectores.

Las enfermedades zoonóticas surgen y se expanden debido a su particular sensibilidad a movimientos de población, cambios ecológicos y la intrusión de humanos y animales domésticos en ambientes selváticos.

La infección por hantavirus se ha relacionado principalmente con trabajadores rurales y personas relacionadas al turismo ecológico. Es imprescindible que las personas con actividades al aire libre tomen las precauciones necesarias para evitar el contagio con el virus (sección 1.2.7).^[2]



1.2.6. Tratamiento

El tratamiento de un paciente con SPH en la unidad de cuidados intensivos tiene como objetivo mantener el balance de líquidos, la oxigenación y la presión arterial en niveles normales. También es importante el temprano suministro de ventilación asistida en caso de ser necesario y la reposición hídrica mediante la administración de agentes ionotrópicos.^[22]

Hasta la fecha no se conocen antivirales, vacunas o inmunoterapias efectivas contra hantavirus.

La ribavirina es un antiviral con acción *in vivo* e *in vitro* contra miembros de las familias *Bunyaviridae* y *Arenaviridae*. Esta reduce la mortalidad de ratones lactantes con encefalitis letal infectados con virus de genotipo *Hantaan* (HTNV). Estudios experimentales realizados en China demostraron que la ribavirina proporciona un pronóstico más alentador para pacientes con FHSR si esta es administrada de manera temprana en la infección. Por otro lado, el fármaco fue evaluado en pacientes con SPH arrojando resultados inconclusos.

Los estudios realizados en pacientes con FHSR muestran que los mismos permanecen en estado de viremia durante la fase aguda de la infección. A su vez, muchos de estos pacientes desarrollan elevados títulos de anticuerpos neutralizantes. La inmunización pasiva a pacientes durante la etapa aguda de la enfermedad puede ser un tratamiento o profilaxis eficaz para el SPH.^[2, 23]

1.2.7. Prevención

La prevención de la infección por hantavirus es enteramente conductual dado que no existen vacunas capaces de ser administradas a las poblaciones en riesgo.

El Ministerio de Salud Pública recomienda seguir las siguientes precauciones para evitar la exposición^[17]:

- Ventilar lugares cerrados por al menos 30 minutos antes de ingresar a los mismos.
- Utilizar objetos de protección personal (guantes, tapa boca, botas de goma) en el momento de la limpieza.
- Evitar la generación de polvo en el ambiente humedeciendo los pisos con agua e hipoclorito.
- En caso de encontrar roedores muertos utilizar guantes y bolsas de nylon.
- Desmalezar y mantener el pasto corto y despejado de elementos que puedan servir de alimento y/o nidación de roedores en el entorno de la vivienda.
- Sellar grietas que puedan proporcionar la entrada de roedores al domicilio.
- Mantener la basura en contenedores herméticos.

1.2.8. Importancia del estudio

Debido a que los hantavirus son los agentes causales de enfermedades graves y a su elevado índice de mortalidad, estos representan un creciente problema para la salud humana en nuestro país. Estos agentes infecciosos, considerados virus emergentes, tienen gran plasticidad



para introducir cambios en su genoma. Las modificaciones de los hábitats naturales pueden resultar además en variaciones en las poblaciones de roedores, y por tanto en riesgo de infección para el hombre. La introducción de nuevas variantes virales, así como los cambios en la distribución de la enfermedad son eventos relativamente comunes, prueba de ello es la evidencia reciente de casos en Artigas y Paysandú. Por esto, se hace necesario continuar las investigaciones con el fin de caracterizar genéticamente los virus que están circulando actualmente en nuestro país.

En el marco de las investigaciones que se llevan a cabo en la Sección Virología, se cuenta con extractos de ARN total obtenidos de muestras con diagnóstico positivo de SPH (período 2006 – 2013). Las mismas son parte de una colaboración con el Departamento de Laboratorios del MSP, donde se realiza la caracterización primaria de estas muestras en base a secuenciación parcial del segmento M. El objetivo central de este trabajo es profundizar en la caracterización genética de estos virus mediante la secuenciación completa del segmento S (aproximadamente 1800 pares de bases). Las secuencias virales obtenidas se compararán con secuencias del resto de América depositadas en las bases de datos.

II. Objetivos.

2. Objetivo general

Estudiar la variabilidad genética de hantavirus causantes de SPH en Uruguay.

2.1. Objetivos específicos

- Diseño de primers y puesta a punto de técnicas de amplificación genómica (retrotranscripción y reacción en cadena de la polimerasa anidada, RT – PCR An) para el segmento S de hantavirus.
- Amplificación y secuenciación del segmento S completo a partir de extractos de ARN total de muestras humanas serológicamente positivas para hantavirus.
- Análisis bioinformático y filogenético de las secuencias obtenidas.
- Identificación de variantes virales.

III. Materiales y métodos.

3. Procedimientos experimentales

3.1. Muestras empleadas

Se trabajó con extractos de ARN total obtenidos de muestras proporcionadas por el Departamento de Laboratorios del MSP cuyo diagnóstico resultó positivo para SPH. En la siguiente tabla se observan las muestras empleadas en el análisis junto con algunos datos de interés.



Tabla 2. Se observan los datos de las muestras utilizadas en el análisis. Se detalla el año, el nombre de la muestra y la localidad del cual provino el paciente. S: Sobrevive, †: Fallece.

Año	Muestra	Localidad	Resolución
2006	041/06	Canelones	S
2007	006/07	Sin datos	†
2010	092/10	Rocha	S
	279/10	Rocha	†
	349/10	Artigas	†
2011	121/11	Canelones	S
2012	038/12	Montevideo*	†
	410/12	Canelones	S
	418/12	Maldonado	S
2013	008/13	Colonia	S
	087/13	Canelones	S

*Posibles sitios de infección Canelones, Maldonado, Rocha.

3.2. Diseño de primers

Se realizó el diseño de los primers mediante la herramienta *primer – BLAST* proporcionada por el sitio web del National Center for Biotechnology Information (NCBI) utilizando la secuencia AF482714.1 de GenBank como referencia.

Esta secuencia corresponde a una cepa de genotipo Lechiguanas la cual contiene un alto grado de homología con las cepas que circulan en nuestro país, razón por la cual fue utilizada como secuencia de referencia.^[13,14]

A continuación se muestra un mapa representativo de la localización de cada uno de ellos.

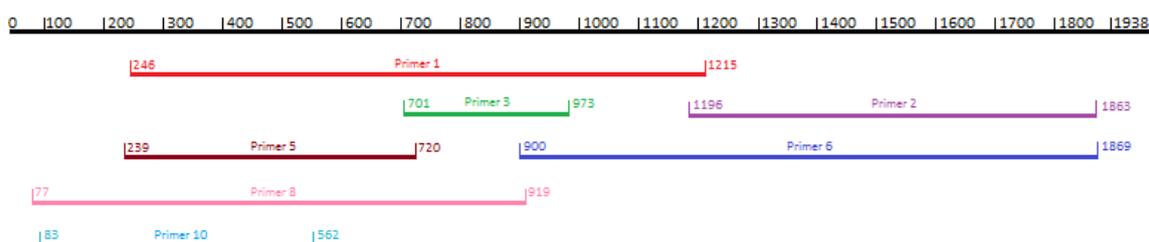


Figura 8. Mapa representativo de la secuencia del virus Lechiguanas AF482714.1 y los primers diseñados a partir de ésta. En color negro se observa la secuencia completa del segmento S, mientras que en color se muestran los distintos fragmentos de amplificación de cada par de primers.



Tabla 3. Primers diseñados. Muestra el color de referencia correspondiente a los datos de la Figura 8, el nombre y secuencia de cada uno de los primers. La longitud del segmento hace referencia a la cantidad de nucleótidos amplificados a partir de cada par de primers.

Ref.	Nombre	Secuencia	Longitud del segmento (nt)
■	Hanta_S_1 forward	5' – GGTGGCAGCTCAAAAAGTGG – 3'	969
	Hanta_S_1 reverse	5' – TGCCTCTTCCCCCATGATA – 3'	
■	Hanta_S_2 forward	5' – TATCATGGGGGAAGGAGGCA – 3'	667
	Hanta_S_2_n reverse	5' – GGTTTGTGGATGAGGTAGTG – 3'	
■	Hanta_S_3 forward	5' – TGGGGGTCATTGGATTGAGC – 3'	272
	Hanta_S_3 reverse	5' – GTGCACATGCAAACACCCAT – 3'	
■	Hanta_S_5 forward	5' – CAGATCTGGTGGCAGCTCAA – 3'	481
	Hanta_S_5 reverse	5' – GCTGAATCCAATGACCCCA – 3'	
■	Hanta_S_6 forward	5' – CGCAGAGACTGAGTCAGCAA – 3'	969
	Hanta_S_6 reverse	5' – GGGGAGGGTTTGTGGATGAG – 3'	
■	Hanta_S_8 forward	5' – CAGCACACGAACAACAGCTC – 3'	842
	Hanta_S_8 reverse	5' – TTGCTGACTCAGTCTCTGCG – 3'	
■	Hanta_S_10 forward	5' – ACGAACAAACAGCTCGTGACT – 3'	479
	Hanta_S_10 reverse	5' – GCTTTCGGATGCCATTGACC – 3'	

3.3. Puesta a punto de las RT-PCR anidadas

Se efectuaron varias reacciones con diferentes condiciones hasta encontrar aquel conjunto de variables que resultó efectivo para todos los juegos de primers. A partir de este análisis se establecieron las condiciones adecuadas para cada uno de los pasos siguientes en el trabajo.

3.4. RT – PCR del segmento S de hantavirus

En primer lugar, por tratarse de un virus con genoma ARN se realizó una retrotranscripción a cada una de las muestras a partir de la cual se obtuvo ADNc viral. Las mismas se realizaron siguiendo el protocolo presentado a continuación.

Tabla 4. Protocolo experimental realizado para las reacciones de retrotranscripción.

Protocolo RT:		
Random primers	1 µL	65°C/5' Hielo/1'
ARN	5 µL	
H₂O	5 µL	
Mix:		
Buffer de reacción 5X	4 µL	25°C/10'
dNTPs 10 mM	2 µL	42°C/60'
MMLV - fermentas	1 µL	70°C/10'

Una vez obtenido el ADNc correspondiente de cada muestra se realizó un primer round de PCR con los primers Hanta_S_8 forward – reverse, y dos segundo round con los primers Hanta_S_5 forward – reverse y Hanta_S_10 forward – reverse, de manera independiente.



De igual forma se realizó una primera ronda de PCR con los primers Hanta_S_1 forward – reverse y Hanta_S_6 forward y reverse, seguido de un segundo round con los primers Hanta_S_3 forward – reverse y Hanta_S_2 forward y new reverse, respectivamente.

Tabla 5. Protocolo diseñado para la realización del primer round de PCR tomando como volumen final 50 µL.

Protocolo PCR primer round:		
Buffer – MgCl ₂ 10X	5,0 µL	
MgCl ₂ 50mM	1,5 µL	
dNTPs 10 mM	1,0 µL	94°C/2'
Primer forward	4,0 µL	94°C/30''
Primer reverse	4,0 µL	55°C/30''
Taq Platinum	0,2 µL	72°C/1'
H ₂ O	29,3 µL	72°C/5'
ADNc	5,0 µL	
Volumen final	50 µL	40 ciclos

Tabla 6. Protocolo experimental correspondiente a las reacciones de segundo round de PCR.

Protocolo PCR segundo round:		
Buffer – MgCl ₂ 10X	5,0 µL	
MgCl ₂ 50mM	1,5 µL	
dNTPs 10 mM	1,0 µL	94°C/2'
Primer forward	4,0 µL	94°C/30''
Primer reverse	4,0 µL	55°C/30''
Taq Platinum	0,2 µL	72°C/1'
H ₂ O	33,3 µL	72°C/5'
ADN Primer round	1,0 µL	
Volumen final	50 µL	40 ciclos

Para obtener las secuencias completas con una menor cantidad de PCRs que realizar, y para lograr amplificar una pequeña porción de la secuencia que no se encontraba disponible con estos conjuntos de primers (región 975 – 1196), se probaron combinaciones de los mismos. Estas se muestran en la siguiente figura.

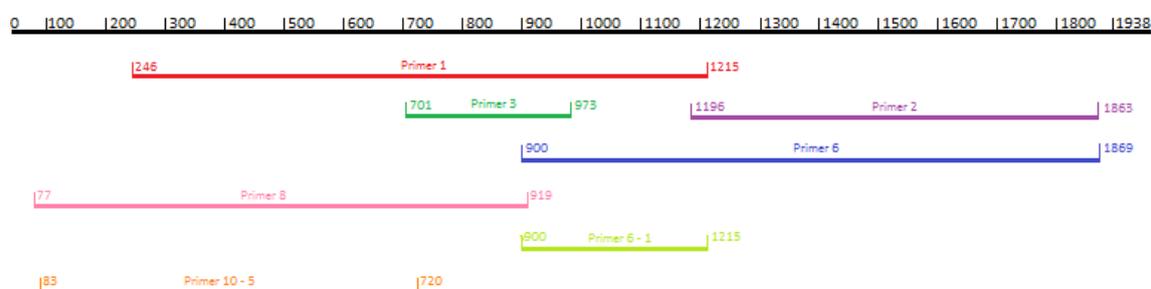


Figura 9. Combinación de primers utilizada para la amplificación completa del segmento S de Hantavirus. En color negro se observa la secuencia completa del segmento S, mientras que en color se muestran los distintos fragmentos de amplificación de cada par de primers.



Tabla 7. Nueva combinación de primers. Se muestra el largo del segmento a obtener por cada nueva combinación.

Ref.	Nombre	Secuencia	Longitud del segmento (nt)
	Hanta_S_10 forward	5' – ACGAACAACAGCTCGTGACT – 3'	637
	Hanta_S_5 reverse	5' – GCTGAATCCAATGACCCCA – 3'	
	Hanta_S_6 forward	5' – CGCAGAGACTGAGTCAGCAA – 3'	315
	Hanta_S_1 reverse	5' – TGCCTCCTTCCCCATGATA – 3'	

Mediante la nueva combinación de primers se logró obtener la secuencia completa del segmento S de Hantavirus en solamente cuatro reacciones de PCR.

3.5. Electroforesis

Luego de realizadas las diferentes reacciones se comprobó la existencia de los fragmentos amplificados mediante geles de agarosa al 1%. Cada una de las corridas electroforéticas se acompañó del sembrado de un marcador de peso molecular (Fermentas) de 100 pares de bases (pb) para poder constatar que la banda observada se corresponde con el fragmento deseado.

3.6. Purificación y secuenciación

Los fragmentos obtenidos a partir de las reacciones de PCR para cada una de las muestras fueron enviados al servicio de secuenciación del Instituto Pasteur para su purificación y posterior secuenciación. Los procesos de secuenciación se realizaron con los dos primers utilizados en las correspondientes reacciones de amplificación de modo de obtener las secuencias forward y reverse para un mejor análisis.

3.7. Análisis bioinformático

Las secuencias obtenidas fueron analizadas, corregidas y empalmadas empleando el programa BioEdit.^[24] Se analizó cada una de las hebras correspondiente a cada fragmento de modo de corregir posibles errores existentes en ellas. Los fragmentos luego fueron empalmados de forma de obtener la secuencia del segmento S completa para cada una de las muestras analizadas.

Las secuencias completas finalmente fueron alineadas entre sí y con secuencias de referencia obtenidas de la base de datos GenBank.

3.8. Análisis filogenético

El grupo de secuencias de referencia a analizar junto con las obtenidas en este trabajo se obtuvo de GenBank. Se incluyeron en el análisis todas las secuencias completas del segmento S disponibles de hantavirus sudamericanos y una submuestra de secuencias de Norteamérica (*Sin Nombre, Monongahela, Convict Creek, New York*).

El modelo de sustitución nucleotídica se estimó mediante el programa *Modelgenerator*^[25], y la filogenia se reconstruyó bajo el criterio de máxima verosimilitud utilizando el programa



Phyml^[26]. El soporte de los nodos se calculó mediante “approximate likelihood ratio test” (aLRT), aceptando como significativos aquellos mayores a 0,8.

Los porcentajes de homología nucleotídica y aminoacídica se calcularon utilizando la distancia *p* en el programa MEGA 6.^[27]

3.9. Análisis de recombinación

Los análisis de recombinación se llevaron a cabo con el programa RDP v3.^[28]

3.10. Análisis de presiones selectivas

Se calcularon las tasas de sustitución no sinónima vs sinónima (dN/dS) para la región codificante de la nucleoproteína. Para ello se utilizó el programa SLAC del servidor Datamonkey.^[29] El modelo de sustitución utilizado para las estimaciones fue el REV (general time reversible).

IV. Resultados y discusión

4. Resultados experimentales

4.1. Amplificación de fragmentos

En primer lugar se obtuvo el ADNc para cada una de las once muestras a partir de reacciones de retrotranscripción. Luego se realizó un primer round con los primers Hanta_S_8 forward y Hanta_S_8 reverse. Al ADN obtenido en éste último se lo sometió a un segundo round de PCR con el par de primers Hanta_S_10 forward – Hanta_S_5 reverse.

Los productos de amplificación generados a partir del segundo round fueron verificados mediante una corrida electroforética en geles de agarosa al 1%.

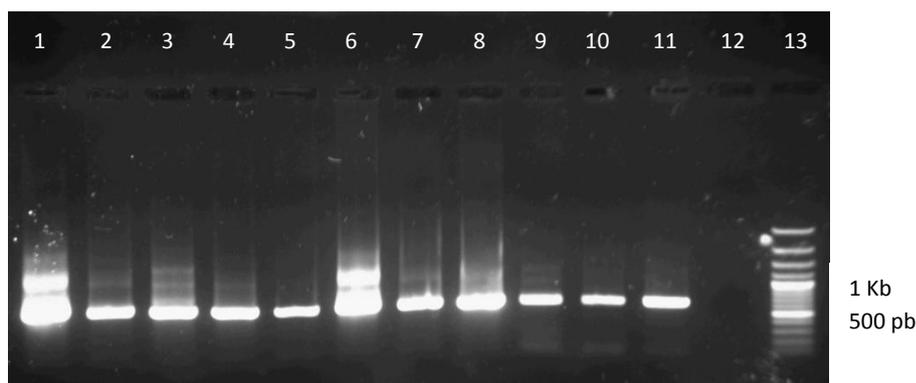


Figura 10. Productos de PCR (pPCR) con primers Hanta_S_10 forward y Hanta_S_5 reverse. Tamaño esperado 637 pb. En todos los casos se sembraron 8 μ L de pPCR junto con 2 μ L de buffer de carga. **Carril 1:** pPCR muestra 041/06.

Carril 2: pPCR muestra 006/07. **Carril 3:** pPCR muestra 092/10. **Carril 4:** pPCR muestra 279/10. **Carril 5:** pPCR muestra 349/10. **Carril 6:** pPCR muestra 121/11. **Carril 7:** pPCR muestra 038/12. **Carril 8:** pPCR muestra 410/12. **Carril 9:** pPCR muestra 418/12. **Carril 10:** pPCR muestra 008/13. **Carril 11:** pPCR muestra 087/13. **Carril 12:** control negativo. **Carril 13:** 3 μ L de MPM Fermentas de 100 pb.



En los carriles 1 – 11 se sembraron los productos de amplificación de las muestras. Se puede visualizar que todos los casos arrojaron resultados positivos para esta serie de reacciones. Las bandas obtenidas son del tamaño esperado siendo este de aproximadamente 637 pb.

Luego se llevó a cabo un primer round de PCR con los primers Hanta_S_1 forward y Hanta_S_1 reverse para posteriormente realizar dos segundos round independientes con los primers Hanta_S_3 forward – Hanta_S_3 reverse y Hanta_S_6 forward – Hanta_S_1 reverse.

A partir de estas reacciones de PCR se obtuvieron dos fragmentos del segmento S de hantavirus, uno de 272 pb y otro de 315 pb producto de la acción de los pares de primers Hanta_S_3 forward – Hanta_S_3 reverse y Hanta_S_6 forward – Hanta_S_1 reverse, respectivamente.

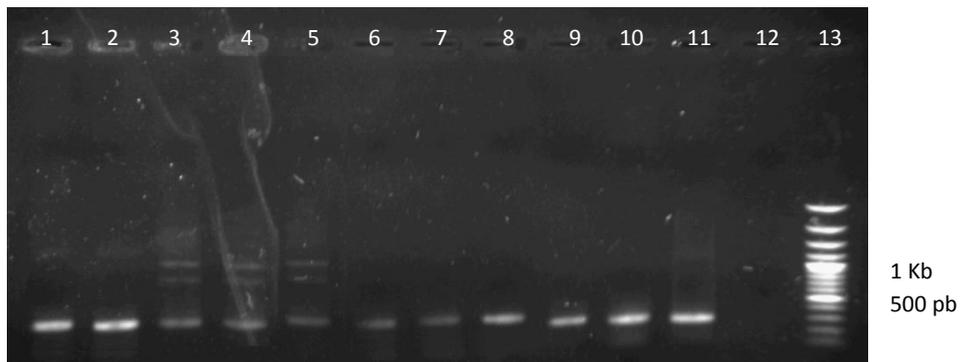


Figura 11. Productos de PCR (pPCR) con primers Hanta_S_3 forward y Hanta_S_3 reverse. Tamaño esperado 272 pb. En todos los casos se sembraron 8 μ L de pPCR junto con 2 μ L de buffer de carga. **Carril 1:** pPCR muestra 041/06. **Carril 2:** pPCR muestra 006/07. **Carril 3:** pPCR muestra 092/10. **Carril 4:** pPCR muestra 279/10. **Carril 5:** pPCR muestra 349/10. **Carril 6:** pPCR muestra 121/11. **Carril 7:** pPCR muestra 038/12. **Carril 8:** pPCR muestra 410/12. **Carril 9:** pPCR muestra 418/12. **Carril 10:** pPCR muestra 008/13. **Carril 11:** pPCR muestra 087/13. **Carril 12:** control negativo. **Carril 13:** 3 μ L de MPM Fermentas de 100 pb.

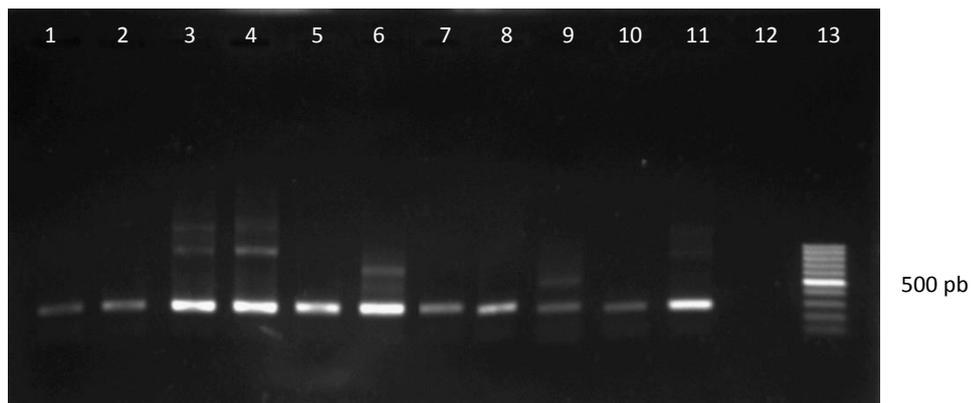


Figura 12. Productos de PCR (pPCR) con primers Hanta_S_6 forward y Hanta_S_1 reverse. Tamaño esperado 315pb. En todos los casos se sembraron 8 μ L de pPCR junto con 2 μ L de buffer de carga. **Carril 1:** pPCR muestra 041/06. **Carril 2:** pPCR muestra 006/07. **Carril 3:** pPCR muestra 092/10. **Carril 4:** pPCR muestra 279/10. **Carril 5:** pPCR muestra 349/10. **Carril 6:** pPCR muestra 121/11. **Carril 7:** pPCR muestra 038/12. **Carril 8:** pPCR muestra 410/12. **Carril 9:** pPCR muestra 418/12. **Carril 10:** pPCR muestra 008/13. **Carril 11:** pPCR muestra 087/13. **Carril 12:** control negativo. **Carril 13:** 3 μ L de MPM Fermentas de 100 pb.



La figura 11 muestra los productos de PCR obtenidos con los primers Hanta_S_3 forward y Hanta_S_3 reverse, observándose que en todos los casos se observa una banda del tamaño esperado (272 pb).

Por otro lado, en la figura 12 se visualizan los pPCR obtenidos de la reacción con los primers Hanta_S_6 forward y Hanta_S_1 reverse. Todos ellos son de tamaño esperado (315 pb) y de buena intensidad.

Finalmente se efectuó una serie de PCRs utilizando en el primer round los primers Hanta_S_6 forward – Hanta_S_6 reverse y luego el par de primers Hanta_S_2 forward – Hanta_S_2_n reverse. En todos los casos se visualiza una banda de aproximadamente 667 pb lo cual indica que la amplificación ocurrió de modo correcto.

Los resultados de las amplificaciones se muestran en la figura siguiente.

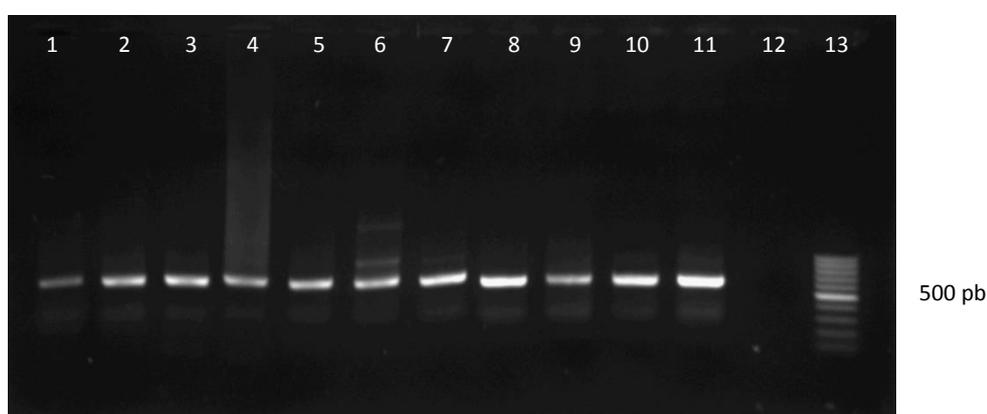


Figura 13. Productos de PCR (pPCR) con primers Hanta_S_2 forward y Hanta_S_2_n reverse. En todos los casos se sembraron 8 μ L de pPCR junto con 2 μ L de buffer de carga. **Carril 1:** pPCR muestra 041/06. **Carril 2:** pPCR muestra 006/07. **Carril 3:** pPCR muestra 092/10. **Carril 4:** pPCR muestra 279/10. **Carril 5:** pPCR muestra 349/10. **Carril 6:** pPCR muestra 121/11. **Carril 7:** pPCR muestra 038/12. **Carril 8:** pPCR muestra 410/12. **Carril 9:** pPCR muestra 418/12. **Carril 10:** pPCR muestra 008/13. **Carril 11:** pPCR muestra 087/13. **Carril 12:** control negativo. **Carril 13:** 3 μ L de MPM Fermentas de 100 pb.

4.2. Análisis bioinformático

Se analizaron y corrigieron las hebras forward y reverse correspondientes a cada uno de los fragmentos de modo de obtener una secuencia consenso para cada uno de ellos. Luego se prosiguió con el empalme de cada uno de los fragmentos con el fin obtener la secuencia S completa para cada una de las muestras. Para esto último se alinearon los cuatro fragmentos correspondientes a una de las muestras con secuencias completas obtenidas de GenBank, de manera que cada uno de ellos se sitúe de modo correcto dentro del segmento S. De esta forma se fueron solapando los fragmentos hasta obtener la secuencia consenso total para cada muestra.

Una vez obtenidas las secuencias completas de todas las muestras, se alinearon entre sí para poder observar sitios de cambio de nucleótidos.



Se pudo observar que existe un alto grado de conservación entre las secuencias si bien existen cambios puntuales en algunas de ellas (ver Anexo I). La mayor parte de dichos cambios ocurren en la tercera base del codón, dando lugar a mutaciones sinónimas (ver Anexo II).

4.3. Análisis filogenético

Debido a que no se cuenta con secuencias completas del segmento S de varios linajes de hantavirus que circulan en la región, en primer lugar se realizó un árbol con todas las nuevas secuencias pero acotadas a los fragmentos de cepas de Uruguay que se encuentran disponibles en GenBank (aproximadamente 400 pares de bases).

Se cortó cada una de las secuencias para que coincidan en longitud con las cepas Lechiguanas/Central Plata que están reportadas en GenBank y así poder realizar un análisis más preciso acerca de la relación existente entre ellas.

Tabla 8. Parámetros utilizados en el análisis filogenético de secuencias parciales.

Análisis de secuencias parciales	
Modelo de sustitución nucleotídica	GTR + I + G
Parámetro gamma	0.780
Proporción de sitios invariables	0.520
Valores de aLRT significativos	> 0,80



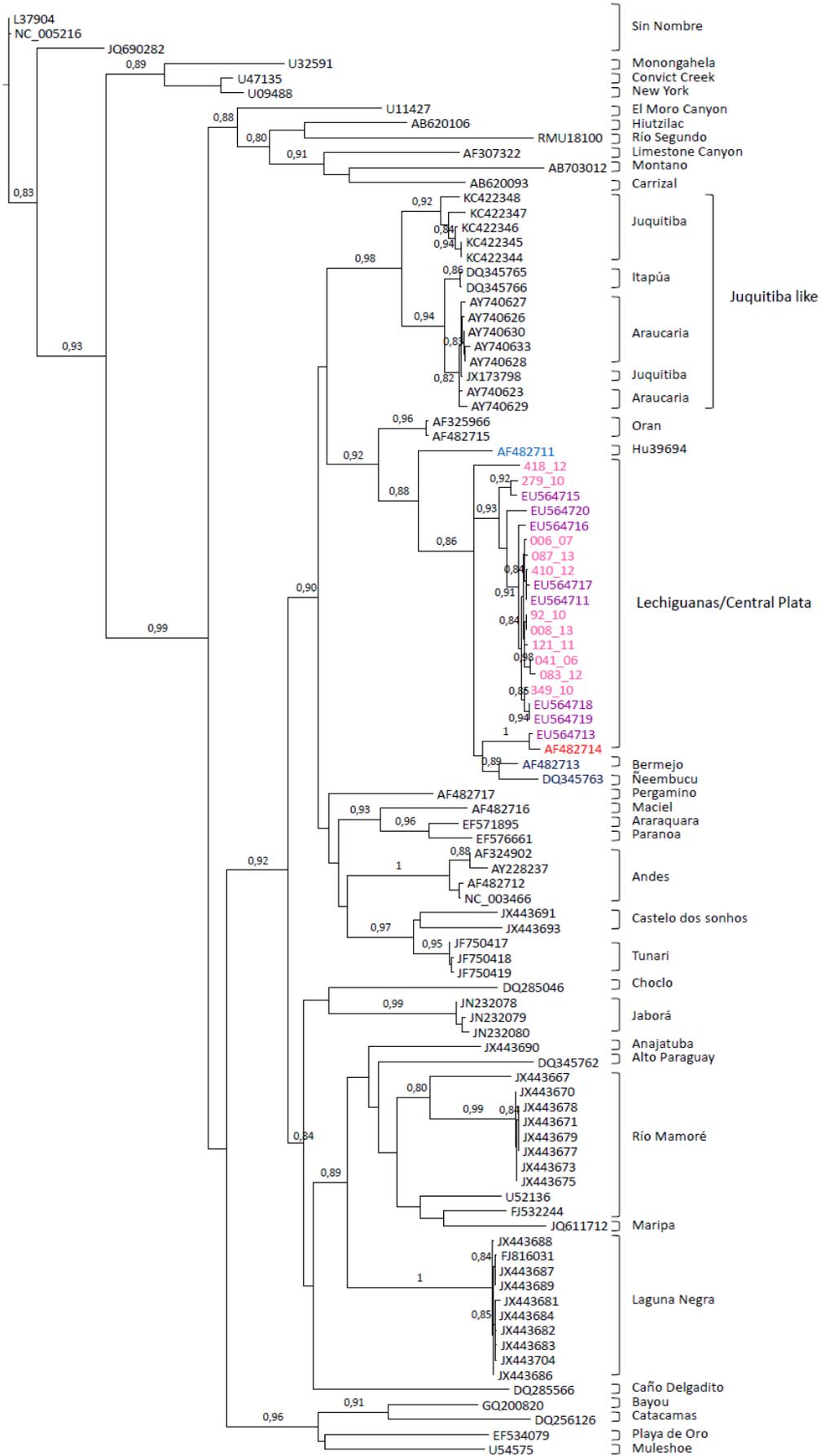


Figura 14. Análisis filogenético del segmento S acotado en aproximadamente 400 pb coincidente con las secuencias existentes de la región. Los virus incluidos son: muestras en estudio (041_06, 006_07, 092_10, 297_10, 349_10, 121_11, 083_12, 410_12, 418_12, 008_13, 087_13); **Alto Paraguay** (DQ345762); **Anajatuba** (JX443690); **Andes** (AF324902, AF482712, AY228237, NC_003466); **Araucaria** (AY740623, AY740626, AY740627, AY740628, AY740629, AY740630, AY740633); **Araraquara** (EF571895); **Bayou** (GQ200820); **Bermejo** (AF482713); **Caño Delgadito** (DQ285566); **Castelo dos Sonhos** (JX443691, JX443693); **Catacamas** (DQ256126); **Convict Creek** (U47135); **Choclo** (DQ285046); **Carrizal** (AB620093); **El Moro Canyon** (U11427); **Huitzilac** (AB620106); **Hu39694** (AF482711); **Itapúa** (DQ345765, DQ345766); **Jabora** (JN232078, JN232079, JN232080); **Juquitiba** (JX173798, KC422344, KC422345, KC422346, KC422347, KC422348); **Laguna Negra** (FJ816031, JX443681, JX443682, JX443683, JX443684, JX443686, JX443687, JX443688, JX443689, JX443704); **Lechiguanas** (AF482714); **Lechiguanas/Central Plata** (EU564711, EU564713, EU564715, EU564716, EU564717, EU564718, EU564719, EU564720); **Limestone Canyon** (AF307322); **Maciel** (AF482716); **Maripa** (JQ611712); **Monongahela** (U32591); **Montano** (AB703012); **Mulshoe** (U54575); **Ñeembucu** (DQ345763); **New York** (U09488); **Oran** (AF325966, AF482715); **Paranoa** (EF576661); **Pergamino** (AF482717); **Playa de Oro** (EF534079); **Río Mamoré** (FJ532244, JX443667, JX443670, JX443671, JX443673, JX443675, JX443677, JX443678, JX443679, U52136); **Río Segundo** (RMU18100); **Sin Nombre** (JQ690282, L37904, NC_005216); **Tunari** (JF750417, JF750418, JF750419).

En la figura puede observarse que todas las secuencias amplificadas a partir de los extractos de ARN de las nuevas cepas 2006 – 2013 pertenecen al genotipo Lechiguanas/Central Plata. Este genotipo es el que circula mayoritariamente en nuestro país.

Las secuencias parciales del genotipo Lechiguanas/Central Plata (EU564711, EU564713, EU564715, EU564716, EU564717, EU564718, EU564719, EU564720) utilizadas para el análisis filogenético de las secuencias en estudio, son secuencias Uruguayas amplificadas a partir de muestras de roedores y de pacientes que resultaron positivos para SPH.

Se puede apreciar que la secuencia 418_12 se ubica en una posición basal dentro del clado Lechiguanas con respecto al resto de las secuencias en estudio. En los sucesivos análisis la secuencia cambia de posición dentro del clado. Esto puede deberse a la posible existencia de eventos de recombinación, por lo cual la mencionada secuencia se sometió a análisis utilizando el programa RDP v3.

Luego se realizó el análisis de la secuencia codificante para la nucleoproteína, región 42 – 1329, en la cual se excluyeron las secuencias previamente reportadas en el país por ser secuencias parciales. El resultado se muestra en la figura 15.

Tabla 9. Parámetros utilizados en el análisis filogenético de las secuencias codificantes.

Análisis de secuencias codificantes	
Modelo de sustitución nucleotídica	GTR + I + G
Parámetro gamma	0,680
Proporción de sitios invariables	0,450
Valores de aLRT significativos	> 0,80



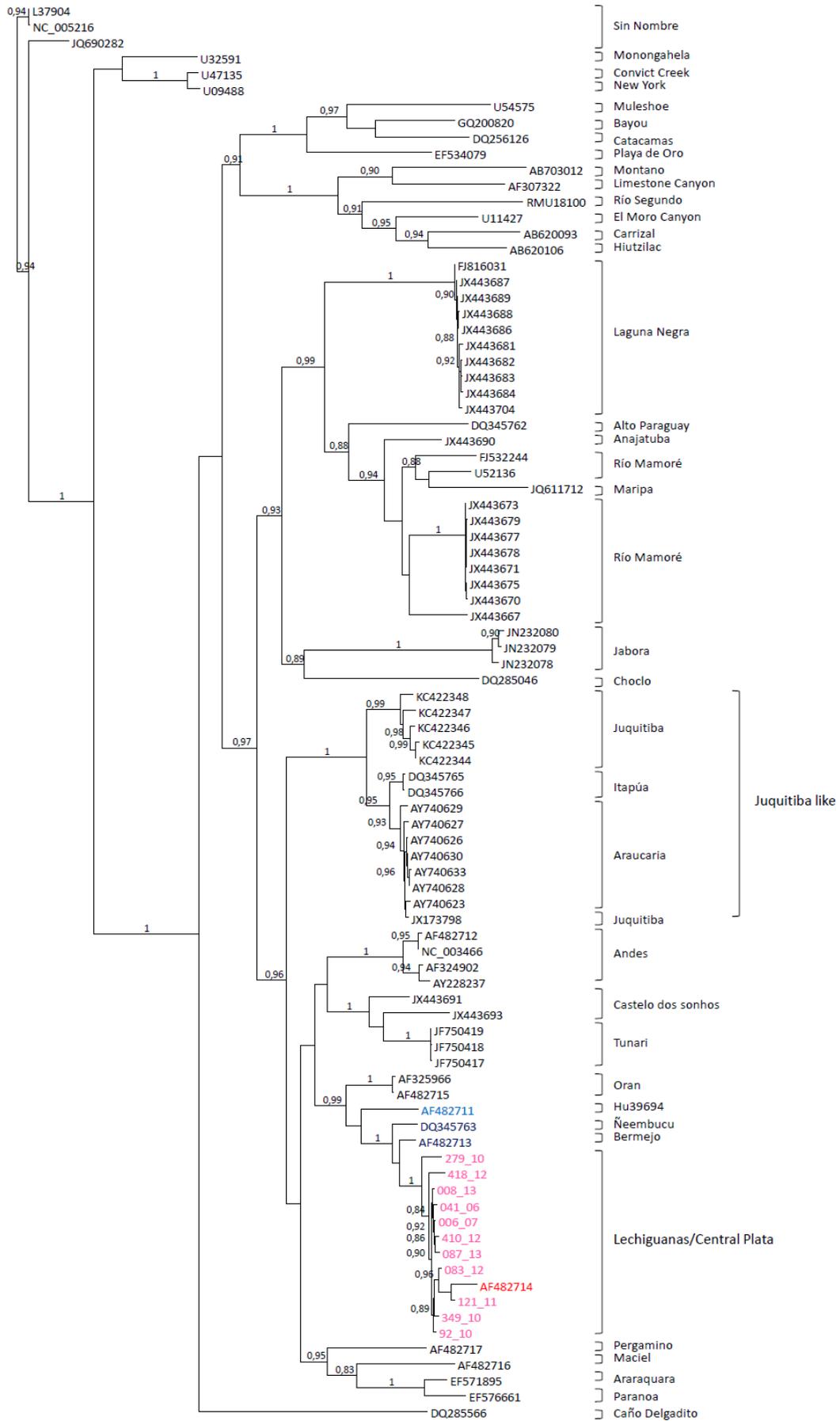


Figura 15. Análisis filogenético de la región codificante del segmento S (42 – 1329), correspondiente a la nucleoproteína viral. Los virus incluidos son: muestras en estudio (041_06, 006_07, 092_10, 297_10, 349_10, 121_11, 083_12, 410_12, 418_12, 008_13, 087_13); **Alto Paraguay** (DQ345762); **Anajatuba** (JX443690); **Andes** (AF324902, AF482712, AY228237, NC_003466); **Araucaria** (AY740623, AY740626, AY740627, AY740628, AY740629, AY740630, AY740633); **Araraquara** (EF571895); **Bayou** (GQ200820); **Bermejo** (AF482713); **Caño Delgadito** (DQ285566); **Castelo dos Sonhos** (JX443691, JX443693); **Catacamas** (DQ256126); **Convict Creek** (U47135); **Choclo** (DQ285046); **Carrizal** (AB620093); **El Moro Canyon** (U11427); **Huitzilac** (AB620106); **Hu39694** (AF482711); **Itapúa** (DQ345765, DQ345766); **Jabora** (JN232078, JN232079, JN232080); **Juquitiba** (JX173798, KC422344, KC422345, KC422346, KC422347, KC422348); **Laguna Negra** (FJ816031, JX443681, JX443682, JX443683, JX443684, JX443686, JX443687, JX443688, JX443689, JX443704); **Lechiguanas** (AF482714); **Limestone Canyon** (AF307322); **Maciel** (AF482716); **Maripa** (JQ611712); **Monongahela** (U32591); **Montano** (AB703012); **Muleshoe** (U54575); **Ñeembucu** (DQ345763); **New York** (U09488); **Oran** (AF325966, AF482715); **Paranoa** (EF576661); **Pergamino** (AF482717); **Playa de Oro** (EF534079); **Río Mamoré** (FJ532244, JX443667, JX443670, JX443671, JX443673, JX443675, JX443677, JX443678, JX443679, U52136); **Río Segundo** (RMU18100); **Sin Nombre** (JQ690282, L37904, NC_005216); **Tunari** (JF750417, JF750418, JF750419).

Finalmente se realizó un análisis filogenético utilizando las secuencias completas de aproximadamente 1800 pb.

Tabla 10. Parámetros utilizados en el análisis filogenético de secuencias completas.

Análisis de secuencias completas	
Modelo de sustitución nucleotídica	GTR + G
Parámetro gamma	0,436
Valores de aLRT significativos	> 0,80



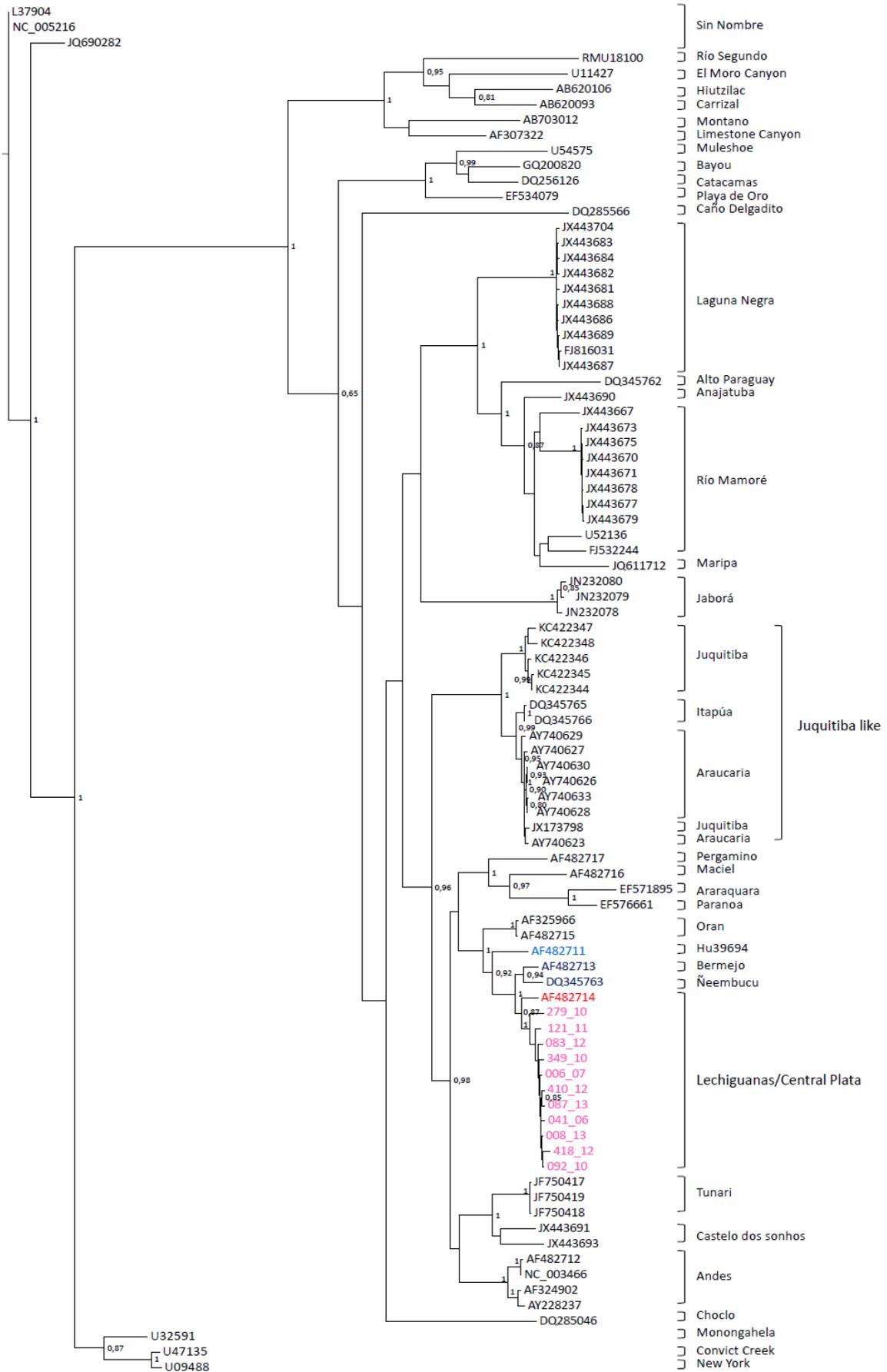


Figura 16. Análisis filogenético del segmento S completo de hantavirus. Los virus incluidos son: muestras en estudio (041_06, 006_07, 092_10, 297_10, 349_10, 121_11, 083_12, 410_12, 418_12, 008_13, 087_13); **Alto Paraguay** (DQ345762); **Anajatuba** (JX443690); **Andes** (AF324902, AF482712, AY228237, NC_003466); **Araucaria** (AY740623, AY740626, AY740627, AY740628, AY740629, AY740630, AY740633); **Araraquara** (EF571895); **Bayou** (GQ200820); **Bermejo** (AF482713); **Caño Delgadito** (DQ285566); **Castelo dos Sonhos** (JX443691, JX443693); **Catacamas** (DQ256126); **Convict Creek** (U47135); **Choclo** (DQ285046); **Carrizal** (AB620093); **El Moro Canyon** (U11427); **Huitzilac** (AB620106); **Hu39694** (AF482711); **Itapúa** (DQ345765, DQ345766); **Jabora** (JN232078, JN232079, JN232080); **Juquitiba** (JX173798, KC422344, KC422345, KC422346, KC422347, KC422348); **Laguna Negra** (FJ816031, JX443681, JX443682, JX443683, JX443684, JX443686, JX443687, JX443688, JX443689, JX443704); **Lechiguanas** (AF482714); **Limestone Canyon** (AF307322); **Maciel** (AF482716); **Maripa** (JQ611712); **Monongahela** (U32591); **Montano** (AB703012); **Muleshoe** (U54575); **Ñeembucu** (DQ345763); **New York** (U09488); **Oran** (AF325966, AF482715); **Paranoa** (EF576661); **Pergamino** (AF482717); **Playa de Oro** (EF534079); **Río Mamoré** (FJ532244, JX443667, JX443670, JX443671, JX443673, JX443675, JX443677, JX443678, JX443679, U52136); **Río Segundo** (RMU18100); **Sin Nombre** (JQ690282, L37904, NC_005216); **Tunari** (JF750417, JF750418, JF750419).

Con el fin de estudiar el grado de homología de las secuencias completas analizadas en la figura 16, se calculó la distancia p intra y entre cada grupo filogenético con soporte estadístico significativo. El análisis se realizó para nucleótidos y aminoácidos. Los resultados se muestran a continuación.

Tabla 11. Se observa la distancia existente entre las secuencias presentes dentro de cada uno de los grupos. **Lechiguanas/Central Plata:** 041_06, 006_07, 092_10, 297_10, 349_10, 121_11, 083_12, 410_12, 418_12, 008_13, 087_13, AF482714; **Alto Paraguay:** DQ345762; **Tunari – Castelo do Sonhos:** JF750417, JF750418, JF750419, JX443687, JX443689, JX443691, JX443693; **Oran:** AF325966, AF482715; **Hu39694:** AF482711; **Juquitiba:** JX173798, KC422344, KC422345, KC422346, KC422347, KC422348; **Araraquara – Paranoa:** EF571895, EF576661; **Bermejo:** AF482713; **Laguna Negra:** FJ816031, JX443681, JX443682, JX443683, JX443684, JX443686, JX443687, JX443688, JX443689; **Maciel:** AF482716; **Maripa:** JQ611712; **Ñeembucu:** DQ345763; **Pergamino:** AF482717; **Río Mamoré:** JX443667, JX443670, JX443671, JX443673, JX443675, JX443677, JX443678, JX443679.

Distancia Intra – Grupos		
	Nucleótidos	Aminoácidos
Lechiguanas/Central Plata	0,032	0,004
Alto Paraguay*	---	---
Tunari – Castelo do Sonhos	0,114	0,026
Oran	0,007	0,003
Hu39694*	---	---
Juquitiba	0,069	0,006
Araraquara – Paranoa	0,096	0,013
Bermejo*	---	---
Laguna Negra	0,009	0,001
Maciel*	---	---
Maripa*	---	---
Neembucu*	---	---
Pergamino*	---	---
Río Mamoré	0,037	0,008

Los grupos señalados con * no poseen valores de distancia por contener una única secuencia.

Se puede observar que en base a la distancia genética existente entre las secuencias de este estudio y la cepa Lechiguanas (AF482714) proveniente de Argentina, que comprenden el grupo Lechiguanas/Central Plata, éstas poseen un alto grado de homología tanto a nivel nucleotídico como de aminoácidos, difiriendo únicamente en un 3,2% en nucleótidos y un 0,4% en aminoácidos.



Tabla 12. Distancia entre los diferentes grupos genotípicos. **1. Lechiguanas/Central Plata:** 041_06, 006_07, 092_10, 297_10, 349_10, 121_11, 083_12, 410_12, 418_12, 008_13, 087_13, AF482714; **2. Alto Paraguay:** DQ345762; **3. Tunari – Castelo do Sonhos:** JF750417, JF750418, JF750419, JX443687, JX443689, JX443691, JX443693; **4. Oran:** AF325966, AF482715; **5. Hu39694:** AF482711; **6. Jujuitiba:** JX173798, KC422344, KC422345, KC422346, KC422347, KC422348; **7. Araraquara – Paranoa:** EF571895, EF576661; **8. Bermejo:** AF482713; **9. Laguna Negra:** FJ816031, JX443681, JX443682, JX443683, JX443684, JX443686, JX443687, JX443688, JX443689; **10. Maciel:** AF482716; **11. Maripa:** JQ611712; **12. Ñeembucu:** DQ345763; **13. Pergamino:** AF482717; **14. Río Mamoré:** JX443667, JX443670, JX443671, JX443673, JX443675, JX443677, JX443678, JX443679.

Distancia Entre – Grupos (Nucleótidos)													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
2	0,208	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
3	0,171	0,206	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
4	0,132	0,213	0,173	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
5	0,143	0,210	0,178	0,133	---	---	---	---	---	---	---	---	---
6	0,175	0,215	0,181	0,170	0,179	---	---	---	---	---	---	---	---
7	0,189	0,225	0,193	0,184	0,197	0,197	---	---	---	---	---	---	---
8	0,083	0,217	0,169	0,135	0,134	0,170	0,194	---	---	---	---	---	---
9	0,214	0,199	0,208	0,218	0,209	0,205	0,216	0,215	---	---	---	---	---
10	0,178	0,225	0,190	0,178	0,183	0,200	0,179	0,184	0,222	---	---	---	---
11	0,204	0,194	0,222	0,203	0,210	0,202	0,205	0,205	0,188	0,217	---	---	---
12	0,099	0,210	0,170	0,138	0,136	0,175	0,201	0,074	0,205	0,182	0,187	---	---
13	0,175	0,221	0,190	0,173	0,180	0,183	0,193	0,184	0,204	0,174	0,221	0,184	---
14	0,214	0,191	0,208	0,208	0,216	0,204	0,216	0,209	0,193	0,213	0,167	0,208	0,221

Distancia Entre – Grupos (Aminoácidos)													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
2	0,108	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
3	0,030	0,110	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
4	0,016	0,105	0,031	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
5	0,005	0,104	0,029	0,011	---	---	---	---	---	---	---	---	---
6	0,032	0,108	0,037	0,022	0,028	---	---	---	---	---	---	---	---
7	0,055	0,104	0,065	0,055	0,051	0,067	---	---	---	---	---	---	---
8	0,002	0,107	0,029	0,014	0,003	0,031	0,053	---	---	---	---	---	---
9	0,091	0,084	0,099	0,089	0,088	0,091	0,107	0,090	---	---	---	---	---
10	0,056	0,110	0,063	0,053	0,052	0,064	0,051	0,055	0,107	---	---	---	---
11	0,094	0,047	0,093	0,094	0,093	0,092	0,100	0,093	0,076	0,101	---	---	---
12	0,010	0,115	0,037	0,022	0,010	0,039	0,061	0,008	0,099	0,063	0,101	---	---
13	0,045	0,101	0,052	0,043	0,041	0,057	0,053	0,044	0,088	0,033	0,096	0,052	---
14	0,099	0,044	0,100	0,097	0,095	0,099	0,107	0,098	0,086	0,113	0,031	0,106	0,102

En las tres filogenias realizadas se puede observar que las secuencias en estudio forman un grupo monofilético con los genotipos Ñeembucu, del norte Argentino, y Bermejo, de Paraguay, demostrando además su gran similitud a nivel genético (90,1% y 91,7% de homología, respectivamente a nivel nucleotídico; 99% y 99,8%, respectivamente a nivel aminoacídico).



Cabe destacar que tanto los genotipos Lechiguanas como Ñeembucu y Bermejo son transmitidos por el mismo reservorio, el roedor *Oligoryzomys flavescens* (A. Delfraro comunicación personal). Todo el grupo mencionado se asocia a una cepa del centro Argentino, denominada Hu39694, de origen humano. Esta cepa también presenta un alto porcentaje de homología a nivel de nucleótidos y aminoácidos y se ha reportado que su reservorio también es *O. flavescens* (S. Levis comunicación personal). Todos los clados mencionados muestran soportes estadísticos significativos (aLRT 0,8 a 1).

A su vez, se observa que también se encuentran emparentadas, aunque en menor medida, con el genotipo Oran el cual también pertenece al norte de Argentina pero es transmitido por otro roedor, el *Oligoryzomys chacoensis*.

Mediante el análisis de las secuencias completas obtenidas en este estudio se pudieron encontrar 202 mutaciones a nivel nucleotídico (ver Anexo I). En cuanto a la región codificante para la nucleoproteína solamente se localizaron 8 cambios (ver Anexo II).

Basado en las secuencias codificantes de las cepas analizadas en la figura 15 se estimó la tasa de sustitución no sinónima vs. sinónima utilizando en programa SLAC del servidor Datamonkey. Los resultados se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 13. Se muestran los sitios de presiones selectivas en las secuencias en estudio. La tasa de sustitución promedio se representa como el cociente entre las sustituciones no sinónimas (dN) y las sinónimas (dS), mientras que para cada codón se utiliza la diferencia dN – dS debido a que si dS es igual a 0 la relación sería infinita.^[27]

Tasa de sustitución promedio (dN/dS): 0,858			
Sitio	dN – dS normalizado	p – valor	Presión
250	5,111	0,087	Positiva
95	-10,392	0,095	Negativa
106	-14,369	0,096	Negativa
238	-31,327	0,004	Negativa
261	-10,485	0,049	Negativa
370	-15,258	0,087	Negativa
386	-28,642	0,011	Negativa
418	-10,640	0,053	Negativa

Se detectó un único sitio sometido a presión positiva en la posición 250 de la región codificante. Este resultado indica que el valor de sustituciones no sinónimas fue mayor que el de sustituciones sinónimas indicando que este sitio es propenso al cambio de aminoácido.

De acuerdo con la literatura existe una región hipervariable dentro de la secuencia del segmento S que comprende los nucleótidos 242 a 281. La misma resulta ser un sitio antigénico de la proteína justificando la variación existente en esta parte de la proteína.^[30,31] El sitio encontrado con el programa SLAC se encuentra dentro de esta región, reafirmando la variabilidad de dicho sitio antigénico.

Por otro lado, se encontraron siete sitios sometidos a presión negativa indicando que en estas posiciones existe una fuerte resistencia al cambio aminoacídico.



A su vez, la tasa dN/dS promedio es de 0,85 (menor a 1) indicando que las secuencias codificantes analizadas muestran una presión de selección globalmente negativa. Estos valores son típicos de las nucleoproteínas, las cuales son proteínas internas que se encuentran asociadas fuertemente al genoma en la partícula viral.

4.4. Análisis de recombinación

Se realizó un análisis de recombinación con el programa RDP v3, para evaluar un posible caso de recombinación en la secuencia 418_12.

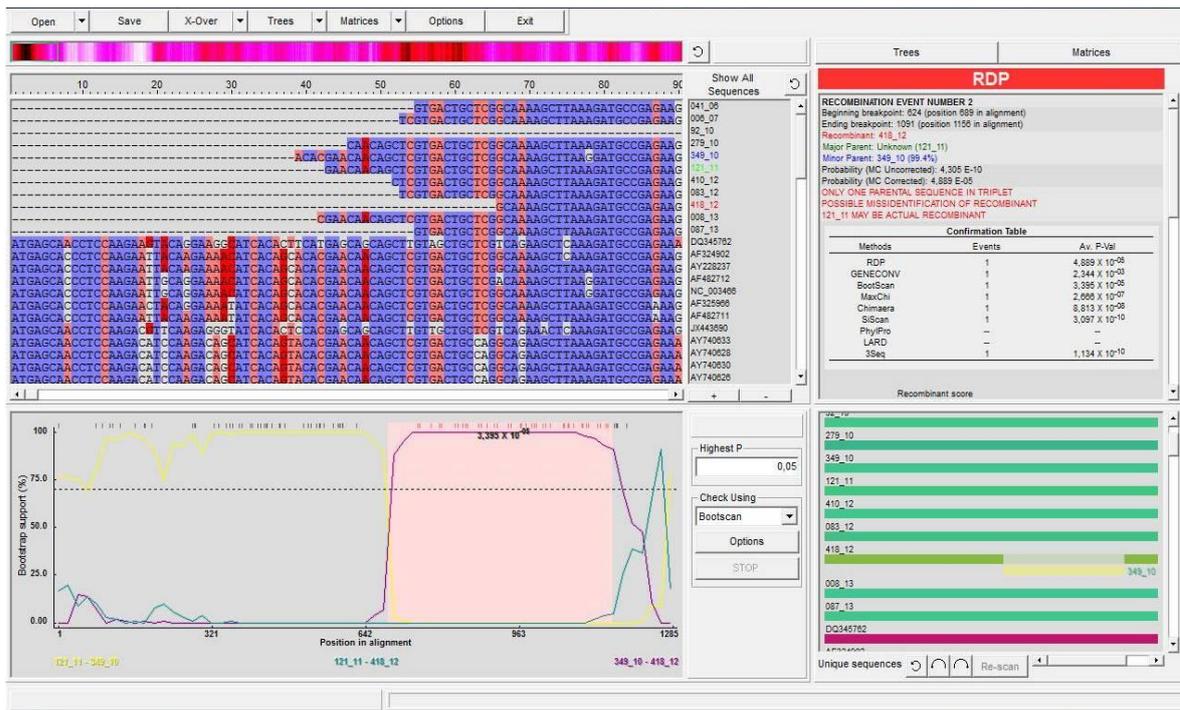


Figura 17. Análisis de recombinación de la secuencia 418_12 con el programa RDP v3. Se observa en amarillo la porción recombinante de la secuencia en estudio.

Se puede observar en la figura que el programa detecta a la secuencia 418_12 como recombinante. A pesar de ello, no se logró determinar con precisión los parentales que participaron en el acto de recombinación por lo que se deberá estudiar esta secuencia en mayor profundidad. Se propone re-secuenciar la región problema, amplificando con nuevos oligonucleótidos, y realizar además el clonaje biológico y posterior secuenciación.



V. Conclusiones

Se obtuvo por primera vez la secuencia completa del segmento S de hantavirus provenientes de casos de SPH ocurridos en Uruguay entre 2006 y 2013.

En las nuevas secuencias se observó que la mayoría de los cambios (202 a nivel nucleotídico) encontrados son del tipo sinónimo, debido a que ocurren en la tercera base del codón.

Todos los virus analizados en este trabajo pertenecen al genotipo Lechiguanas/Central Plata, el cual es el mayoritario en Uruguay y circula además en la región central de Argentina. Este grupo se encuentra altamente emparentado con cepas de Paraguay y Norte de Argentina (Ñeembucu y Bermejo), con las que además comparte el mismo reservorio natural. Los análisis mostraron que todas las muestras pertenecientes al genotipo Lechiguanas/Central Plata presentan elevados porcentajes de homología intragrupo (96,8% a nivel nucleotídico y 99,6% a nivel aminoacídico) y entre-grupo con los genotipos Ñeembucu y Bermejo (90,1% y 91,7%, respectivamente).

Las secuencias del segmento S analizadas muestran una mayor proporción de cambios sinónimos, con una tasa dN/dS global de 0,858. Se detectó un único sitio bajo presión selectiva positiva el cual forma parte de una región antigénica de la nucleoproteína descrita previamente. Siete sitios se encuentran bajo presión negativa indicando una gran resistencia al cambio aminoacídico en estas regiones.

Se detectó la presencia de una posible cepa recombinante que requerirá un estudio más detallado para reafirmar su condición.

VI. Perspectivas

En primer lugar, se espera realizar un estudio detallado de la secuencia 418_12 para poder conocer más acerca de este potencial recombinante.

También se quiere estudiar la presencia de un posible marco abierto de lectura secundario en el segmento S, el cual da lugar a una proteína no estructura (NSs). Este sitio secundario y la potencial proteína que codifica fueron reportados previamente en el virus Andes, un genotipo de hantavirus que circula en el sur de Argentina y Chile.

A su vez, nos planteamos continuar la caracterización molecular de estos virus, secuenciando el segmento M, que codifica para las glicoproteínas de superficie, y el segmento L, que da lugar a la polimerasa viral. De este último no hay información disponible hasta el momento para cepas de Uruguay.

Finalmente, se realizaría una comparación de las secuencias obtenidas en este estudio con secuencias virales provenientes de roedores hantavirus positivos de nuestro país y de la región.



Referencias.

- [1] Fields, B.N.; Knipe, D.M.; Howley, P.M., (1995). *Fields Virology*. 3a ed. United States, Lippincott – Raven.
- [2] Jonsson, C.B.; Figueiredo, L.T.; and Vapalahti, O., (2010). A global perspective on hantavirus ecology, epidemiology, and disease. *Clinical Microbiology Rev.* 23(2): p. 412-41.
- [3] Viralzone. Disponible desde: http://viralzone.expasy.org/all_by_species/213.html [Acceso 3 de Setiembre 2014].
- [4] CDC – Hantavirus. Disponible desde: <http://www.cdc.gov/hantavirus/> [Acceso 3 de Setiembre 2014].
- [5] Epidemiología Molecular de Enfermedades Infecciosas. Disponible desde: <http://epidemiologiamolecular.com/bunyavirus/> [Acceso 6 de Setiembre 2014].
- [6] de Borba, L.; Delfraro A.; Maboni S. M.; Duarte, C. N.; (2013). First evidence of asymptomatic infection related to the Araucaria (Jquitiba-like) hantavirus. *BMJ Case reports*, p.2-4.
- [7] Nichol, S.T.; Spiropoulou, C.F.; Morzunov, S.; Rollin, P.E.; Ksiazek, T.G.; Feldmann, H.; Sanchez, A.; Childs, J.; (1993). Genetic identification of a hantavirus associated with an outbreak of acute respiratory illness. *Science*, 262(5135): p. 914-917.
- [8] Enria, D.A.; Levis, S.C.; (2004). Zoonosis virales emergentes: las infecciones por hantavirus Introducción e historia. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, 23(2), p. 595-611.
- [9] Song, J.W.; Kang, H.; Song, K.; Truong, T.T.; Bennett, S.N.; Arai, S.; Truong, N.U.; Yanagihara, R.; (2007). Newfound Hantavirus in Chinese Mole Shrew, Vietnam. *Emerg Infect Dis*, p. 11-14.
- [10] Gu, S.H.; Kang, H.J.; Baek, L.J.; Noh, J.Y.; Kim, H.C; Klein, T.A.; Yanagihara, R.; Song, J.W.; (2011). Genetic diversity of Imjin virus in the Ussuri white-toothed shrew (*Crocidura lasiura*) in the Republic of Korea, 2004-2010. *Virology Journal*, 8(1), p. 56.
- [11] Arai, S.; Ohdachi, S.D.; Asakawa, M.; Kang, H.J.; Mocz, G.; Arikawa, J.; Okabe, N.; Yanagihara, R.; (2008). Molecular phylogeny of a newfound hantavirus in the Japanese shrew mole (*Urotrichus talpoides*). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 105 (42), pp. 16296–16301.
- [12] Padula, P.J.; Colavecchia, S.B.; Martinez, V.P.; Gonzales Della Valle, M.O.; Edelstein, A.; Miguel, S.D.; Russi, J.; Mora Riquelme, J.; Colucci, N.; Almiro, M.; Rabinovich, R.D.; (2000). Genetic diversity, distribution, and serological features of hantavirus infection in five countries in South America. *Journal of clinical microbiology*, 38(8): p. 3029-35.
- [13] Delfraro, A.; Clara, M.; Tomé, L.; Achaval, F.; Levis, S.; Calderón, G.; Enria, D.; Lozano, M.; Russi, J.; Arbiza, J.; (2003). Yellow pigmy rice rat (*Oligoryzomys flavescens*) and hantavirus pulmonary syndrome in Uruguay. *Emerg Infect Dis*, 9(7): p. 846-52.



- [14] Delfraro, A.; Tomé, L.; D'Elía, G.; Clara, M.; Achaval, F.; Russi, J.; Arbiza, J.; (2008). Jujuitiba-like hantavirus from 2 nonrelated rodent species, Uruguay. *Emerg Infect Dis*, 14(9): p. 1447-51.
- [15] Weissenbacher, M.C.; Cura, E.; Segura, E.L.; et al.; (1996). Serological evidence of human Hantavirus infection in Argentina, Bolivia and Uruguay. *Medicina (B Aires)*, 56(1): p. 17-22.
- [16] Bohlman, M.C.; Morzunov, S.P.; Meissner, J.; et al.; (2002). Analysis of hantavirus genetic diversity in Argentina: S segment-derived phylogeny. *J Virol*, 76(8): p. 3765-73.
- [17] División de Epidemiología. Departamento de vigilancia en salud. M.S.P. (2010). Hantaviriosis. Actualización a mayo 2010.
- [18] XX congreso panamericano de infectología. 2011. Diagnóstico serológico y caracterización molecular de Hantavirus en Uruguay, 1997-2010. Morel, N.B., Analía; Cánepa, Elena; Goñi, Natalia; Delfraro, Adriana; Chiparelli, Héctor.
- [19] Raboni, S.M.; Levis, S.; Rosa, E.; Bisordi, I.; Delfraro, A.; Lemos, E.; Correia, D.C.; Duarte dos Santos, C.N.; (2007). Hantavirus infection in Brazil: development and evaluation of an enzyme immunoassay and immunoblotting based on N recombinant protein. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 58(1): p. 89-97.
- [20] Levis, S.; Morzunov, S.; Rowe, J.; Enria, D; Pini, N.; Calderón, G; (1998). Genetic diversity and epidemiology of hantaviruses in Argentina. *J Infect Dis*, 177(3): p. 529-38.
- [21] Soza, G.; Lorca, P.; Puebla, S.; Wenzel, M.; Navarrete, M.; Villagra, E.; Mora, J.; Levis, S.; Aviles, G.; (2000). Síndrome pulmonar por hantavirus en población infantil. Chile: regiones IX y X. 1998-2000. *Rev Chil Infect*, (17)3: p. 248-257.
- [22] Vignoli, R.; Calvelo, E.; Chiparelli, H.; Schelotto, F.; Ingold, E.; del Monte, A.; Campione, J.; Agentes de infecciones emergentes, Hantavirus, Dengue, BSE. *Temas de bacteriología y virología clínica*, p. 567-576.
- [23] Ye, C.; Prescott, J.; Nofchissey, R.; Goade, D.; Hjelle, B.; (2004). Neutralizing Antibodies and Sin Nombre Virus RNA after Recovery from Hantavirus Cardiopulmonary Syndrome. *Emerging Infectious Diseases*, p. 478-482.
- [24] Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41:95-98.
- [25] Keane, T.M.; Creevey, C.J.; Pentony, M.M.; Naughton, T.J.; McInerney, J.O.; (2006). Assessment of methods for amino acid matrix selection and their use on empirical data shows that ad hoc assumptions for choice of matrix are not justified. *BMC evolutionary biology*, 6, p. 29.
- [26] Phylml. Disponible desde: <http://www.atgc-montpellier.fr/phylml/> [Acceso 3 de Agosto 2014]



- [27] Koichiro Tamura, Glen Stecher, Daniel Peterson, Alan Filipski, and Sudhir Kumar (2013) MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*:30 2725-2729.
- [28] Martin, D.P.; Lemey, P.; Lott, M.; Moulton, V.; Posada, D.; Lefeuve, P.; (2010). RDP3: a flexible and fast computer program for analyzing recombination. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 26(19), pp. 2462–3.
- [29] Datamonkey. Disponible desde: <http://www.datamonkey.org/> [Acceso 27 de Noviembre 2014]
- [30] Hörling, J.; Chizhikov, V.; Lundkvist, A.; Jonsson, M.; Ivanov, L.; Dekonenko, A.; Niklasson, B.; Dzagurova, T.; Peters, C.J.; Tkachenko, E.; Nichol, S.; (1994). Khabarovsk virus : a phylogenetically and serologically distinct Hantavirus isolated from *Microtus fortis* trapped in far-east Russia. *Journal of General Virology*, pp. 687-694.
- [31] Plyusnin, A.; Vapalahti, O.; Lankinen, H.; Lehvaslaiho, H.; Apekina, N.; Myasnikov, Y.; Kallio-Kokko, H.; Henttonen, H.; Lundkvist, A.; Brummer-Korvenkontio, M.; Gavrilovskaya, I.; Vaheri, A.; (1994). Tula Virus : Newly Detected Hantavirus Carried by European Common Voles. *J of Virol*, (36), pp. 7833-7839.



I. Anexo I – Alineamiento nucleotídico

Muestra 041-06	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G	T
Muestra 006-07	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	C	.	.
Muestra 092-10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Muestra 279-10	-	-	-	-	-	-	C	A	A	C	A	G	C	T	C	.	.	
Muestra 349-10	A	C	A	C	G	A	A	C	A	A	C	A	G	C	T	C	.	.
Muestra 121-11	-	-	-	-	G	A	A	C	A	A	C	A	G	C	T	C	.	.
Muestra 083-12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	C	.	.
Muestra 410-12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	C	T	C	.	.
Muestra 418-12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Muestra 008-13	-	-	-	C	G	A	A	C	A	A	C	A	G	C	T	C	.	.
Muestra 087-13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	.	.
Muestra 041-06	G	A	C	T	G	C	T	C	G	G	C	A	A	A	A	G	C	T
Muestra 006-07
Muestra 092-10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Muestra 279-10
Muestra 349-10
Muestra 121-11
Muestra 083-12
Muestra 410-12
Muestra 418-12	-	-	-	-	-	-	-	-
Muestra 008-13
Muestra 087-13
Muestra 041-06	T	A	A	A	G	A	T	G	C	C	G	A	G	A	A	G	A	C
Muestra 006-07
Muestra 092-10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Muestra 279-10
Muestra 349-10	.	.	.	G
Muestra 121-11
Muestra 083-12
Muestra 410-12
Muestra 418-12
Muestra 008-13
Muestra 087-13
Muestra 041-06	G	G	T	G	G	A	G	G	T	G	G	A	C	C	C	G	G	A
Muestra 006-07
Muestra 092-10	-	-	-	-	-	-	-
Muestra 279-10
Muestra 349-10
Muestra 121-11
Muestra 083-12
Muestra 410-12
Muestra 418-12	A	A	.	.
Muestra 008-13
Muestra 087-13	A	.	.

Muestra 041-06	T	G	A	G	G	T	T	A	A	C	A	A	G	A	G	C	A	C
Muestra 006-07
Muestra 092-10
Muestra 279-10
Muestra 349-10
Muestra 121-11	.	.	.	A
Muestra 083-12
Muestra 410-12
Muestra 418-12	.	.	.	C
Muestra 008-13
Muestra 087-13

Muestra 041-06	A	C	T	A	C	A	A	A	G	T	A	G	A	C	G	G	G	C
Muestra 006-07	.	T
Muestra 092-10
Muestra 279-10
Muestra 349-10
Muestra 121-11	.	T
Muestra 083-12
Muestra 410-12	.	T
Muestra 418-12
Muestra 008-13
Muestra 087-13	.	T

Muestra 041-06	A	G	C	T	G	T	G	T	C	T	A	C	A	T	T	G	G	A
Muestra 006-07
Muestra 092-10	T	T
Muestra 279-10
Muestra 349-10
Muestra 121-11
Muestra 083-12
Muestra 410-12
Muestra 418-12	C
Muestra 008-13
Muestra 087-13

Muestra 041-06	G	A	C	C	A	A	A	C	T	C	G	G	G	G	A	A	C	T
Muestra 006-07
Muestra 092-10
Muestra 279-10
Muestra 349-10
Muestra 121-11
Muestra 083-12
Muestra 410-12
Muestra 418-12	G	.	.
Muestra 008-13
Muestra 087-13

Muestra 041-06	C	A	A	G	A	G	A	C	A	A	C	T	T	G	C	A	G	A
Muestra 006-07	T



Muestra 092-10	T
Muestra 279-10
Muestra 349-10
Muestra 121-11
Muestra 083-12
Muestra 410-12
Muestra 418-12	A	G
Muestra 008-13	T
Muestra 087-13

Muestra 041-06	T	T	T	G	G	T	G	G	C	A	G	C	T	C	A	A	A	A	
Muestra 006-07
Muestra 092-10	.	C
Muestra 279-10	.	C
Muestra 349-10
Muestra 121-11
Muestra 083-12
Muestra 410-12
Muestra 418-12
Muestra 008-13
Muestra 087-13

Muestra 041-06	A	C	T	G	G	C	T	A	C	A	A	A	A	C	C	A	G	T	
Muestra 006-07
Muestra 092-10
Muestra 279-10
Muestra 349-10
Muestra 121-11
Muestra 083-12
Muestra 410-12
Muestra 418-12
Muestra 008-13
Muestra 087-13

Muestra 041-06	T	G	A	T	C	C	A	A	C	A	G	G	G	C	T	T	G	A	
Muestra 006-07
Muestra 092-10
Muestra 279-10
Muestra 349-10
Muestra 121-11
Muestra 083-12
Muestra 410-12
Muestra 418-12
Muestra 008-13
Muestra 087-13

Muestra 041-06	G	C	C	T	G	A	T	G	A	T	C	A	T	C	T	A	A	A	
Muestra 006-07
Muestra 092-10
Muestra 279-10
Muestra 349-10



Muestra 121-11
Muestra 083-12
Muestra 410-12
Muestra 418-12
Muestra 008-13
Muestra 087-13

Muestra 041-06	G	G	A	A	A	A	G	T	C	A	T	C	C	C	T	G	A	G
Muestra 006-07
Muestra 092-10
Muestra 279-10	T
Muestra 349-10	A	.	.
Muestra 121-11	T
Muestra 083-12
Muestra 410-12
Muestra 418-12	T	.	.	.	T
Muestra 008-13
Muestra 087-13

Muestra 041-06	G	T	A	T	G	G	C	A	A	T	G	T	T	C	T	G	G	A
Muestra 006-07
Muestra 092-10
Muestra 279-10	T
Muestra 349-10
Muestra 121-11
Muestra 083-12
Muestra 410-12
Muestra 418-12
Muestra 008-13
Muestra 087-13

Muestra 041-06	T	G	T	C	A	A	C	T	C	C	A	T	T	G	A	T	C	T
Muestra 006-07
Muestra 092-10
Muestra 279-10
Muestra 349-10
Muestra 121-11
Muestra 083-12
Muestra 410-12
Muestra 418-12
Muestra 008-13
Muestra 087-13

Muestra 041-06	C	G	A	A	G	A	A	C	C	G	A	G	T	G	G	A	C	A
Muestra 006-07
Muestra 092-10
Muestra 279-10	T
Muestra 349-10	A
Muestra 121-11	A
Muestra 083-12	G
Muestra 410-12



Muestra 418-12	G	C
Muestra 008-13
Muestra 087-13
Muestra 041-06	A	A	C	T	G	C	C	G	A	T	T	G	G	A	G	G	T	C
Muestra 006-07
Muestra 092-10
Muestra 279-10
Muestra 349-10
Muestra 121-11
Muestra 083-12
Muestra 410-12	C
Muestra 418-12	T	A	.	.	.
Muestra 008-13
Muestra 087-13
Muestra 041-06	T	A	T	C	G	G	G	G	C	T	T	A	T	A	T	A	C	T
Muestra 006-07	C
Muestra 092-10	.	.	.	T
Muestra 279-10
Muestra 349-10
Muestra 121-11
Muestra 083-12
Muestra 410-12	C
Muestra 418-12	.	.	.	T	T	.
Muestra 008-13	.	.	.	T
Muestra 087-13	C
Muestra 041-06	G	G	G	T	T	T	T	G	C	A	A	T	A	C	C	A	A	T
Muestra 006-07	.	.	.	G
Muestra 092-10
Muestra 279-10	.	.	.	C	G	.	.	.
Muestra 349-10	.	.	.	G
Muestra 121-11
Muestra 083-12	.	.	.	G
Muestra 410-12	.	.	.	G
Muestra 418-12
Muestra 008-13
Muestra 087-13	.	.	.	G
Muestra 041-06	T	A	T	C	C	T	A	A	A	G	G	C	C	T	T	G	T	A
Muestra 006-07
Muestra 092-10
Muestra 279-10	C
Muestra 349-10
Muestra 121-11
Muestra 083-12
Muestra 410-12
Muestra 418-12	.	.	.	A	.	.	T
Muestra 008-13
Muestra 087-13	A



Muestra 041-06	C	A	T	G	C	T	C	T	C	C	A	C	C	G	G	G	G
Muestra 006-07
Muestra 092-10
Muestra 279-10	T
Muestra 349-10	T
Muestra 121-11
Muestra 083-12
Muestra 410-12
Muestra 418-12	T	T	A	.	.
Muestra 008-13
Muestra 087-13

Muestra 041-06	T	C	G	G	C	A	A	A	C	T	G	T	C	A	A	G	G	A
Muestra 006-07
Muestra 092-10
Muestra 279-10	G	G	T
Muestra 349-10	T
Muestra 121-11
Muestra 083-12
Muestra 410-12	C
Muestra 418-12	G	.	.	A
Muestra 008-13
Muestra 087-13

Muestra 041-06	C	A	A	C	A	A	A	G	G	G	A	C	A	A	G	G	A	T
Muestra 006-07
Muestra 092-10
Muestra 279-10	A	C
Muestra 349-10
Muestra 121-11
Muestra 083-12	A	.	.
Muestra 410-12
Muestra 418-12	A	.	.	.	T
Muestra 008-13
Muestra 087-13

Muestra 041-06	A	C	G	A	T	T	T	A	A	G	G	A	T	G	A	T	T	C
Muestra 006-07
Muestra 092-10
Muestra 279-10	.	.	.	G	C
Muestra 349-10
Muestra 121-11
Muestra 083-12
Muestra 410-12
Muestra 418-12	.	.	.	G
Muestra 008-13
Muestra 087-13

Muestra 041-06	A	T	C	A	T	T	T	G	A	G	G	A	G	G	T	T	A	A
Muestra 006-07

Muestra 092-10
Muestra 279-10	C	C	.
Muestra 349-10
Muestra 121-11
Muestra 083-12
Muestra 410-12
Muestra 418-12
Muestra 008-13
Muestra 087-13	A

Muestra 041-06	T	G	G	C	A	T	T	C	G	T	A	A	G	C	C	T	A	A	
Muestra 006-07	G
Muestra 092-10	G	
Muestra 279-10	C	.	.	G	C	.	.	
Muestra 349-10	G	
Muestra 121-11	G	
Muestra 083-12	
Muestra 410-12	G	
Muestra 418-12	C	.	.	G	A	.	.	
Muestra 008-13	G	
Muestra 087-13	G	

Muestra 041-06	A	C	A	C	C	T	G	T	A	T	G	T	G	T	C	T	A	T
Muestra 006-07	G
Muestra 092-10	G
Muestra 279-10	G	.	.	.	T
Muestra 349-10	G
Muestra 121-11	G
Muestra 083-12
Muestra 410-12	G
Muestra 418-12	G	.	.	T	A	.	.
Muestra 008-13	G
Muestra 087-13	G

Muestra 041-06	G	C	C	T	A	C	A	G	C	A	C	A	G	T	C	A	A	C
Muestra 006-07	.	.	.	C
Muestra 092-10	.	.	.	C
Muestra 279-10	.	.	.	A	G	.	.
Muestra 349-10	.	.	.	C
Muestra 121-11	.	.	.	C
Muestra 083-12
Muestra 410-12	.	.	.	C
Muestra 418-12	.	.	.	A	.	.	T	A
Muestra 008-13	.	.	.	C
Muestra 087-13	.	.	.	C

Muestra 041-06	A	A	T	G	A	A	G	G	C	T	G	A	A	G	A	A	A	T
Muestra 006-07
Muestra 092-10
Muestra 279-10
Muestra 349-10



Muestra 418-12	G
Muestra 008-13	G
Muestra 087-13	G

Muestra 041-06	T	C	C	T	G	T	C	A	T	G	G	G	G	T	C	A	T	
Muestra 006-07
Muestra 092-10
Muestra 279-10
Muestra 349-10
Muestra 121-11
Muestra 083-12
Muestra 410-12
Muestra 418-12
Muestra 008-13
Muestra 087-13

Muestra 041-06	T	G	G	A	T	T	C	A	G	C	T	T	C	T	T	T	G	T	
Muestra 006-07
Muestra 092-10	A	
Muestra 279-10	
Muestra 349-10	
Muestra 121-11	
Muestra 083-12	
Muestra 410-12	
Muestra 418-12	
Muestra 008-13	
Muestra 087-13	C	

Muestra 041-06	G	A	A	G	G	A	T	T	G	G	A	T	G	G	A	A	A	G
Muestra 006-07
Muestra 092-10
Muestra 279-10	T
Muestra 349-10
Muestra 121-11
Muestra 083-12
Muestra 410-12
Muestra 418-12
Muestra 008-13
Muestra 087-13

Muestra 041-06	G	A	T	A	G	A	A	G	A	T	T	C	T	T	G	G	C	
Muestra 006-07
Muestra 092-10
Muestra 279-10	C
Muestra 349-10
Muestra 121-11
Muestra 083-12
Muestra 410-12
Muestra 418-12
Muestra 008-13
Muestra 087-13



Muestra 041-06	A	G	C	T	G	A	A	T	G	T	C	C	T	T	T	C	T	T
Muestra 006-07
Muestra 092-10
Muestra 279-10	C	.	.	T	.	.
Muestra 349-10
Muestra 121-11
Muestra 083-12
Muestra 410-12
Muestra 418-12
Muestra 008-13
Muestra 087-13

Muestra 041-06	A	C	C	C	A	A	A	C	C	A	A	A	A	G	C	T	C	C
Muestra 006-07
Muestra 092-10
Muestra 279-10	G	.	.	T	G	A	.	.	.
Muestra 349-10
Muestra 121-11	G	.	.	A	.
Muestra 083-12	G	.	.	A	.
Muestra 410-12
Muestra 418-12
Muestra 008-13
Muestra 087-13

Muestra 041-06	A	T	C	T	G	A	A	G	C	A	T	T	C	A	T	G	G	C
Muestra 006-07
Muestra 092-10
Muestra 279-10
Muestra 349-10
Muestra 121-11
Muestra 083-12
Muestra 410-12
Muestra 418-12
Muestra 008-13
Muestra 087-13

Muestra 041-06	C	A	C	T	A	A	T	A	A	A	G	C	C	T	A	C	T	T
Muestra 006-07
Muestra 092-10
Muestra 279-10	.	.	.	C
Muestra 349-10
Muestra 121-11	.	.	.	C
Muestra 083-12	.	.	.	C
Muestra 410-12
Muestra 418-12
Muestra 008-13
Muestra 087-13

Muestra 041-06	C	T	T	A	A	A	T	A	G	A	C	A	A	A	G	A	C	A
Muestra 006-07	C



Muestra 418-12	
Muestra 008-13	
Muestra 087-13	
Muestra 041-06	A	T	A	T	G	T	T	G	C	T	G	G	T	G	T	T	C	C
Muestra 006-07
Muestra 092-10	G
Muestra 279-10
Muestra 349-10	G
Muestra 121-11	C
Muestra 083-12	G
Muestra 410-12
Muestra 418-12
Muestra 008-13
Muestra 087-13	C	.
Muestra 041-06	A	G	A	A	T	T	G	G	G	T	G	C	A	T	T	C	T	T
Muestra 006-07
Muestra 092-10
Muestra 279-10	.	.	.	G	C	T	.
Muestra 349-10
Muestra 121-11	C	T	.
Muestra 083-12
Muestra 410-12
Muestra 418-12
Muestra 008-13
Muestra 087-13
Muestra 041-06	T	G	C	C	A	T	C	C	T	A	C	A	G	G	A	T	A	T
Muestra 006-07
Muestra 092-10
Muestra 279-10
Muestra 349-10
Muestra 121-11	.	.	.	T	.	.	T
Muestra 083-12
Muestra 410-12
Muestra 418-12
Muestra 008-13
Muestra 087-13
Muestra 041-06	G	C	G	G	A	A	T	A	C	A	A	T	C	A	T	G	G	C
Muestra 006-07
Muestra 092-10
Muestra 279-10	.	.	.	A	.	.	C	.	.	G
Muestra 349-10
Muestra 121-11	.	.	.	A	G
Muestra 083-12
Muestra 410-12	.	.	.	T
Muestra 418-12
Muestra 008-13	.	.	.	T
Muestra 087-13	.	.	.	C



Muestra 041-06	T	T	C	A	A	A	G	T	C	T	G	T	A	G	G	A	A	C
Muestra 006-07
Muestra 092-10
Muestra 279-10
Muestra 349-10
Muestra 121-11	A
Muestra 083-12
Muestra 410-12
Muestra 418-12
Muestra 008-13
Muestra 087-13	C

Muestra 041-06	A	G	C	T	G	A	A	G	A	A	A	A	C	T	G	A	A	
Muestra 006-07
Muestra 092-10
Muestra 279-10	T
Muestra 349-10
Muestra 121-11	G	.	.	G
Muestra 083-12
Muestra 410-12	C
Muestra 418-12
Muestra 008-13
Muestra 087-13

Muestra 041-06	A	A	A	G	A	A	A	T	C	T	G	C	T	T	T	C	T	A
Muestra 006-07
Muestra 092-10
Muestra 279-10
Muestra 349-10
Muestra 121-11	G	.	.	A	C
Muestra 083-12
Muestra 410-12	C
Muestra 418-12
Muestra 008-13	C
Muestra 087-13	C

Muestra 041-06	C	C	A	G	T	C	A	T	A	C	T	T	A	A	G	A	A	G
Muestra 006-07
Muestra 092-10
Muestra 279-10	G
Muestra 349-10
Muestra 121-11	G	.	.	G	.	.
Muestra 083-12
Muestra 410-12
Muestra 418-12
Muestra 008-13
Muestra 087-13

Muestra 041-06	G	A	C	G	C	A	A	T	C	T	A	T	G	G	G	G	A	T
Muestra 006-07

Muestra 092-10	
Muestra 279-10	.	.	.	A	
Muestra 349-10	C	
Muestra 121-11	.	.	.	A	
Muestra 083-12	
Muestra 410-12	
Muestra 418-12	
Muestra 008-13	
Muestra 087-13	
Muestra 041-06	T	C	A	A	C	T	G	G	A	C	C	A	A	A	A	A	A	T	
Muestra 006-07
Muestra 092-10
Muestra 279-10
Muestra 349-10
Muestra 121-11	T	G	.	.
Muestra 083-12
Muestra 410-12
Muestra 418-12
Muestra 008-13
Muestra 087-13
Muestra 041-06	C	A	T	A	A	T	C	C	T	T	T	A	C	A	T	G	C	T	
Muestra 006-07
Muestra 092-10
Muestra 279-10	T	T
Muestra 349-10
Muestra 121-11	C	.	.	T
Muestra 083-12
Muestra 410-12
Muestra 418-12
Muestra 008-13
Muestra 087-13
Muestra 041-06	A	T	C	A	T	G	G	G	G	G	A	A	G	G	A	G	G	C	
Muestra 006-07
Muestra 092-10	A	.	.	A
Muestra 279-10	A	.	.	A
Muestra 349-10	A	.	.	A	.	G	A	.	.	.
Muestra 121-11
Muestra 083-12	A
Muestra 410-12	A	.	.	A	.	G	A	.	.	.
Muestra 418-12
Muestra 008-13
Muestra 087-13	A
Muestra 041-06	A	G	T	A	A	A	C	C	A	C	T	T	T	C	A	C	C	T	
Muestra 006-07
Muestra 092-10
Muestra 279-10	.	.	.	G	T	.	.	C	.	.	T	.	.	.
Muestra 349-10	T	.	.	.



Muestra 121-11	T	.	.
Muestra 083-12
Muestra 410-12
Muestra 418-12
Muestra 008-13
Muestra 087-13

Muestra 041-06	T	G	G	T	G	A	T	G	A	T	A	T	G	G	A	T	C	C	
Muestra 006-07
Muestra 092-10
Muestra 279-10
Muestra 349-10
Muestra 121-11
Muestra 083-12
Muestra 410-12
Muestra 418-12
Muestra 008-13
Muestra 087-13

Muestra 041-06	T	G	A	G	C	T	T	A	G	A	C	A	G	C	T	T	G	C	
Muestra 006-07
Muestra 092-10
Muestra 279-10	A	.	.	.
Muestra 349-10
Muestra 121-11
Muestra 083-12
Muestra 410-12
Muestra 418-12
Muestra 008-13
Muestra 087-13

Muestra 041-06	T	C	A	G	T	C	C	T	T	G	A	T	T	G	A	T	A	C	
Muestra 006-07
Muestra 092-10
Muestra 279-10	C	T
Muestra 349-10
Muestra 121-11
Muestra 083-12
Muestra 410-12
Muestra 418-12
Muestra 008-13
Muestra 087-13	C

Muestra 041-06	T	A	A	G	G	T	G	A	A	G	G	A	G	A	T	T	T	C	
Muestra 006-07
Muestra 092-10
Muestra 279-10
Muestra 349-10
Muestra 121-11
Muestra 083-12
Muestra 410-12



Muestra 418-12
Muestra 008-13
Muestra 087-13
Muestra 041-06	C	A	A	T	C	A	A	G	A	G	C	C	A	T	T	A	A	A	
Muestra 006-07
Muestra 092-10
Muestra 279-10
Muestra 349-10
Muestra 121-11
Muestra 083-12
Muestra 410-12
Muestra 418-12
Muestra 008-13
Muestra 087-13
Muestra 041-06	G	C	T	G	T	A	A	G	A	C	C	T	A	A	C	A	A	C	
Muestra 006-07	G	G	.	.	
Muestra 092-10	G	.	.	
Muestra 279-10	G	
Muestra 349-10	G	G	.	.	
Muestra 121-11	G	.	.	
Muestra 083-12	G	G	.	.	
Muestra 410-12	T	G	.	.	
Muestra 418-12	G	.	.	
Muestra 008-13	G	.	.	
Muestra 087-13	G	.	.	
Muestra 041-06	T	C	T	C	A	G	A	G	C	C	A	T	C	A	C	T	G	C	
Muestra 006-07
Muestra 092-10
Muestra 279-10	T	
Muestra 349-10
Muestra 121-11
Muestra 083-12
Muestra 410-12
Muestra 418-12
Muestra 008-13
Muestra 087-13
Muestra 041-06	T	A	T	A	A	G	A	G	T	C	A	A	A	T	G	G	T	T	
Muestra 006-07	C	A	.	.	.	
Muestra 092-10	C	
Muestra 279-10	C	C	A	.	.	.	
Muestra 349-10	.	.	.	G	C	A	.	.	.	
Muestra 121-11	C	
Muestra 083-12	C	A	.	.	.	
Muestra 410-12	C	.	.	.	C	
Muestra 418-12	C	
Muestra 008-13	C	
Muestra 087-13	C	



Muestra 041-06	A	A	T	A	T	C	T	G	A	A	G	A	T	G	A	T	G	T	
Muestra 006-07
Muestra 092-10
Muestra 279-10	G
Muestra 349-10
Muestra 121-11
Muestra 083-12
Muestra 410-12
Muestra 418-12
Muestra 008-13
Muestra 087-13

Muestra 041-06	T	A	G	T	T	A	G	G	T	G	G	G	T	T	T	T	T	C	
Muestra 006-07
Muestra 092-10
Muestra 279-10	.	T	A	C	C	
Muestra 349-10	.	G
Muestra 121-11
Muestra 083-12
Muestra 410-12
Muestra 418-12
Muestra 008-13
Muestra 087-13	.	.	A

Muestra 041-06	G	G	G	C	T	T	G	T	G	C	C	A	A	G	T	A	T	T	
Muestra 006-07
Muestra 092-10
Muestra 279-10	T
Muestra 349-10
Muestra 121-11
Muestra 083-12
Muestra 410-12
Muestra 418-12
Muestra 008-13
Muestra 087-13

Muestra 041-06	T	A	T	T	C	A	T	C	T	C	A	G	G	A	T	T	C	T	
Muestra 006-07	.	.	A
Muestra 092-10	-
Muestra 279-10	.	.	A
Muestra 349-10	.	.	A
Muestra 121-11	-
Muestra 083-12	.	.	A
Muestra 410-12
Muestra 418-12	-
Muestra 008-13	-
Muestra 087-13

Muestra 041-06	T	T	A	A	T	G	T	G	A	T	T	A	A	T	A	C	G	G	
Muestra 006-07



Muestra 092-10
Muestra 279-10
Muestra 349-10
Muestra 121-11
Muestra 083-12
Muestra 410-12
Muestra 418-12
Muestra 008-13
Muestra 087-13

Muestra 041-06	G	T	T	G	A	T	T	A	T	A	A	G	G	G	T	G	G	T	.	
Muestra 006-07
Muestra 092-10	.	.	.	A
Muestra 279-10
Muestra 349-10
Muestra 121-11	.	.	.	A
Muestra 083-12	.	C	G
Muestra 410-12
Muestra 418-12	.	.	.	A
Muestra 008-13	.	.	.	A
Muestra 087-13

Muestra 041-06	A	A	G	T	G	G	G	T	T	T	C	A	A	T	T	A	C	T	.	
Muestra 006-07
Muestra 092-10
Muestra 279-10
Muestra 349-10
Muestra 121-11
Muestra 083-12
Muestra 410-12
Muestra 418-12
Muestra 008-13
Muestra 087-13

Muestra 041-06	A	A	C	T	A	T	G	G	G	T	A	T	G	G	G	A	A	C	.	
Muestra 006-07
Muestra 092-10
Muestra 279-10	C	G
Muestra 349-10
Muestra 121-11
Muestra 083-12
Muestra 410-12
Muestra 418-12
Muestra 008-13
Muestra 087-13

Muestra 041-06	A	C	T	A	C	T	A	T	C	C	T	T	T	G	C	A	C	T	.	
Muestra 006-07
Muestra 092-10
Muestra 279-10
Muestra 349-10



Muestra 121-11
Muestra 083-12
Muestra 410-12
Muestra 418-12
Muestra 008-13
Muestra 087-13

Muestra 041-06	A	G	G	G	T	C	A	A	G	G	G	T	C	A	T	T	A	G
Muestra 006-07	T	T	C	.	.	T	.	.
Muestra 092-10	C	C
Muestra 279-10	T	C	C
Muestra 349-10	C	C	C
Muestra 121-11	C	C
Muestra 083-12	C	C
Muestra 410-12	C	C	.	.	C	.	.
Muestra 418-12	C	C
Muestra 008-13	C	C
Muestra 087-13	C	C

Muestra 041-06	T	A	T	A	T	G	T	T	T	G	C	A	C	T	A	C	T	A	
Muestra 006-07
Muestra 092-10
Muestra 279-10	G
Muestra 349-10
Muestra 121-11
Muestra 083-12
Muestra 410-12
Muestra 418-12
Muestra 008-13
Muestra 087-13

Muestra 041-06	G	G	G	T	T	G	G	G	G	G	T	A	A	T	G	T	T	A	
Muestra 006-07
Muestra 092-10
Muestra 279-10	A
Muestra 349-10	A
Muestra 121-11
Muestra 083-12	T
Muestra 410-12
Muestra 418-12
Muestra 008-13
Muestra 087-13

Muestra 041-06	A	G	T	T	T	G	T	A	G	T	T	T	G	T	A	A	T	T	
Muestra 006-07	A
Muestra 092-10	C	A
Muestra 279-10	A
Muestra 349-10	.	.	G	.	.	C	A
Muestra 121-11	C	A
Muestra 083-12	A
Muestra 410-12	C	A



Muestra 418-12	C	A
Muestra 008-13	C	A
Muestra 087-13	C	A
Muestra 041-06	A	G	T	T	G	G	T	A	A	G	A	T	A	G	G	T	A	T	
Muestra 006-07	A	T	.	.	.	
Muestra 092-10	A	
Muestra 279-10	A	A	T	.	.	.	
Muestra 349-10	A	T	.	.	.	
Muestra 121-11	A	
Muestra 083-12	A	T	.	.	.	
Muestra 410-12	A	
Muestra 418-12	A	
Muestra 008-13	A	
Muestra 087-13	A	
Muestra 041-06	A	A	A	G	T	A	G	A	C	A	T	A	G	G	A	A	T	T	
Muestra 006-07	
Muestra 092-10	
Muestra 279-10	
Muestra 349-10	
Muestra 121-11	
Muestra 083-12	
Muestra 410-12	
Muestra 418-12	
Muestra 008-13	
Muestra 087-13	
Muestra 041-06	G	A	T	T	A	A	G	T	A	G	A	T	A	A	A	T	A	G	
Muestra 006-07	
Muestra 092-10	
Muestra 279-10	G		
Muestra 349-10	C		
Muestra 121-11		
Muestra 083-12		
Muestra 410-12		
Muestra 418-12		
Muestra 008-13		
Muestra 087-13		
Muestra 041-06	C	C	A	G	A	T	G	A	A	A	T	C	T	T	T	G	A	T	
Muestra 006-07	C		
Muestra 092-10	C		
Muestra 279-10	A		
Muestra 349-10	C		
Muestra 121-11	C		
Muestra 083-12	C		
Muestra 410-12	C		
Muestra 418-12	C		
Muestra 008-13	C		
Muestra 087-13	C		



Muestra 041-06	T	G	A	T	T	G	G	C	T	A	T	C	A	T	T	G	T	T
Muestra 006-07	C
Muestra 092-10
Muestra 279-10
Muestra 349-10
Muestra 121-11
Muestra 083-12
Muestra 410-12
Muestra 418-12
Muestra 008-13
Muestra 087-13

Muestra 041-06	A	A	T	C	A	T	A	G	G	A	T	T	T	A	G	T	T	T
Muestra 006-07	A	.	.	.
Muestra 092-10
Muestra 279-10
Muestra 349-10
Muestra 121-11
Muestra 083-12
Muestra 410-12
Muestra 418-12
Muestra 008-13
Muestra 087-13

Muestra 041-06	A	A	G	T	T	A	A	G	G	T	T	G	A	T	C	A	T	T
Muestra 006-07	A
Muestra 092-10
Muestra 279-10
Muestra 349-10
Muestra 121-11
Muestra 083-12	A	G	.
Muestra 410-12
Muestra 418-12
Muestra 008-13
Muestra 087-13

Muestra 041-06	A	G	T	A	C	A	C	T	T	A	G	G	T	T	T	A	A	G
Muestra 006-07
Muestra 092-10
Muestra 279-10	C
Muestra 349-10	T
Muestra 121-11
Muestra 083-12
Muestra 410-12
Muestra 418-12
Muestra 008-13
Muestra 087-13	T

Muestra 041-06	A	T	A	A	A	C	T	A	A	C	A	A	T	T	A	T	T	A
Muestra 006-07



Muestra 092-10
Muestra 279-10
Muestra 349-10
Muestra 121-11
Muestra 083-12
Muestra 410-12	.	.	.	G
Muestra 418-12
Muestra 008-13
Muestra 087-13	G

Muestra 041-06	T	A	A	T	C	C	A	T	T	G	G	A	T	G	T	A	A	A
Muestra 006-07
Muestra 092-10
Muestra 279-10
Muestra 349-10
Muestra 121-11
Muestra 083-12
Muestra 410-12
Muestra 418-12
Muestra 008-13
Muestra 087-13

Muestra 041-06	T	T	T	C	G	T	T	C	A	T	T	G	C	T	T	T	G	C
Muestra 006-07
Muestra 092-10
Muestra 279-10	A
Muestra 349-10
Muestra 121-11
Muestra 083-12	A
Muestra 410-12
Muestra 418-12
Muestra 008-13
Muestra 087-13

Muestra 041-06	T	G	C	T	T	T	C	T	G	C	T	A	C	A	C	T	A	A
Muestra 006-07	T	C
Muestra 092-10
Muestra 279-10	C	T
Muestra 349-10	T
Muestra 121-11
Muestra 083-12	T	C
Muestra 410-12
Muestra 418-12
Muestra 008-13
Muestra 087-13

Muestra 041-06	C	T	T	A	C	A	A	C	A	A	C	-	-	-	-	-	-	-
Muestra 006-07	.	.	C	A	C	T	-	-	-	-
Muestra 092-10	.	.	C	-	-	-	-	-	-	-
Muestra 279-10	.	.	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Muestra 349-10	.	.	C	A	C	T	A	-	-	-



Muestra 121-11	.	.	C	A	C	T	A	C	C	T
Muestra 083-12	.	.	C	A	C	T	-	-	-	-
Muestra 410-12	.	.	C	A	C	T	A	-	-	-
Muestra 418-12	.	.	C	A	C	T	A	C	C	T
Muestra 008-13	.	.	C	A	C	T	A	C	C	T
Muestra 087-13	.	.	C	A	C	T	-	-	-	-
Muestra 041-06	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Muestra 006-07	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Muestra 092-10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Muestra 279-10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Muestra 349-10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Muestra 121-11	C	A	T	C	C	A	C	A	A	A	C	C	C	T	C	C	C	C
Muestra 083-12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Muestra 410-12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Muestra 418-12	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Muestra 008-13	C	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Muestra 087-13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Muestra 041-06	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Muestra 006-07	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Muestra 092-10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Muestra 279-10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Muestra 349-10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Muestra 121-11	A	T	C	C	T	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Muestra 083-12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Muestra 410-12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Muestra 418-12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Muestra 008-13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Muestra 087-13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-



II. Anexo II – Alineamiento aminoacídico

Muestra 041-06	-	-	-	-	-	V	T	A	R	Q	K	L	K	D	A	E	K	T	V	E	
Muestra 006-07	-	-	-	-	-	
Muestra 092-10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Muestra 279-10	-	-	Q	Q	L	
Muestra 349-10	H	E	Q	Q	L	
Muestra 121-11	-	E	Q	Q	L	
Muestra 083-12	-	-	-	-	-	
Muestra 410-12	-	-	-	-	L	
Muestra 418-12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Muestra 008-13	-	E	Q	Q	L	
Muestra 087-13	-	-	-	-	-	
Muestra 041-06	V	D	P	D	E	V	N	K	S	T	L	Q	S	R	R	A	A	V	S	T	
Muestra 006-07
Muestra 092-10	S
Muestra 279-10
Muestra 349-10
Muestra 121-11
Muestra 083-12
Muestra 410-12
Muestra 418-12	D
Muestra 008-13
Muestra 087-13
Muestra 041-06	L	E	T	K	L	G	E	L	K	R	Q	L	A	D	L	V	A	A	Q	K	
Muestra 006-07
Muestra 092-10
Muestra 279-10
Muestra 349-10
Muestra 121-11
Muestra 083-12
Muestra 410-12
Muestra 418-12
Muestra 008-13
Muestra 087-13
Muestra 041-06	L	A	T	K	P	V	D	P	T	G	L	E	P	D	D	H	L	K	E	K	
Muestra 006-07
Muestra 092-10
Muestra 279-10
Muestra 349-10
Muestra 121-11
Muestra 083-12
Muestra 410-12
Muestra 418-12
Muestra 008-13
Muestra 087-13
Muestra 041-06	S	S	L	R	Y	G	N	V	L	D	V	N	S	I	D	L	E	E	P	S	



Muestra 410-12
 Muestra 418-12
 Muestra 008-13
 Muestra 087-13

Muestra 041-06 E S K V Q D I V D L I D H A E T E S A T
 Muestra 006-07
 Muestra 092-10
 Muestra 279-10
 Muestra 349-10
 Muestra 121-11
 Muestra 083-12
 Muestra 410-12
 Muestra 418-12
 Muestra 008-13
 Muestra 087-13

Muestra 041-06 L F T D I A T P H S V W V F A C A P D R
 Muestra 006-07
 Muestra 092-10
 Muestra 279-10
 Muestra 349-10
 Muestra 121-11
 Muestra 083-12
 Muestra 410-12
 Muestra 418-12
 Muestra 008-13
 Muestra 087-13

Muestra 041-06 C P P T A L Y V A G V P E L G A F F A I
 Muestra 006-07
 Muestra 092-10
 Muestra 279-10
 Muestra 349-10
 Muestra 121-11
 Muestra 083-12
 Muestra 410-12
 Muestra 418-12
 Muestra 008-13
 Muestra 087-13

Muestra 041-06 L Q D M R N T I M A S K S V G T A E E K
 Muestra 006-07
 Muestra 092-10
 Muestra 279-10
 Muestra 349-10
 Muestra 121-11
 Muestra 083-12
 Muestra 410-12
 Muestra 418-12
 Muestra 008-13



