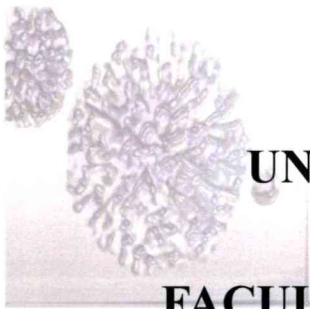


1053



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MUSEO

ESTUDIOS MOLECULARES-EVOLUTIVOS Y DE VIRULENCIA EN HERPESVIRUS POTENCIALMENTE ABORTIGÉNICOS PARA EL EQUINO.

Giselle Martín Ocampos

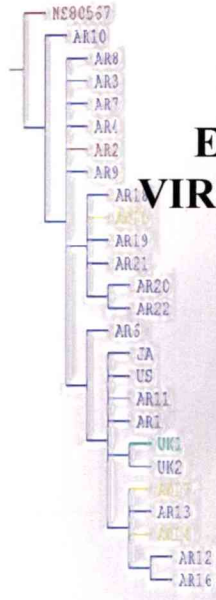
Trabajo de Tesis para optar al título de Doctor en Ciencias Naturales.

Director : Dra. Cecilia Mónica Galosi.

Codirector: Dr. Claudio Gustavo Barbeito.

2009.

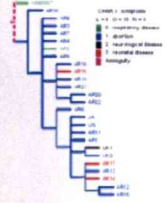
Tree 0, char. 1510 (6 steps)



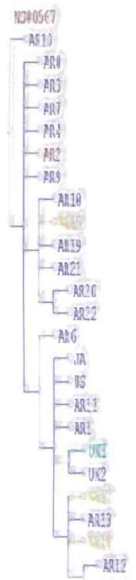
- state 0
- state 1
- state 2
- state 3
- state 4
- state 5
- state 6
- state 7
- state 8
- state 9
- Ambiguous



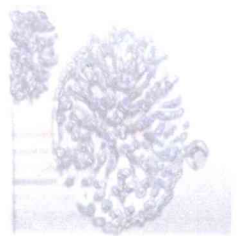
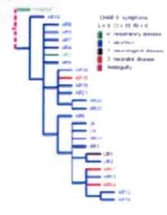
- state 0
- state 1
- state 2
- state 3
- state 4
- state 5
- state 6
- state 7
- state 8
- state 9
- Ambiguous



Tree 0, char. 1510 (6 steps)



- state 0
- state 1
- state 2
- state 3
- state 4
- state 5
- state 6
- state 7
- state 8
- state 9
- Ambiguous



AGRADECIMIENTOS.

A mis padres, sin cuyo apoyo incondicional esta tesis no hubiese sido posible.

A mis directores, Dra. Cecilia Galosi y Dr. Claudio Barbeito, por permitirme realizar este trabajo de tesis, haber fomentado mi crecimiento profesional y por haberme valorado y respetado en todo momento.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por el apoyo económico brindado a través de la beca que me fue concedida.

A la Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires (CIC) y a la Asociación Argentina de Veterinaria Equina (AAVE) por los subsidios otorgados para el desarrollo de este trabajo.

A las Cátedras de Virología e Histología por facilitarme mi lugar de trabajo.

A la Universidad Nacional de La Plata, por la excelente formación académica que imparte.

A mis compañeros docentes y no docentes de la Cátedra de Virología e Histología por su amistad, colaboración y contención.

A la Dra María Marta Cigliano y al Dr Leandro Jones por su desinteresada e incondicional colaboración en esta tesis, por sus consejos y el respaldo brindado en todo momento.

A la Dra María Barrandeguy del CICV- INTA Castelar por haber cedido gentilmente algunas de las cepas que se utilizaron en este estudio.



BIBLIOTECA
"Florentino Ameghino"

ÍNDICE.

ABREVIATURAS	6
RESÚMEN.	8
ABSTRACT.	12
1. INTRODUCCIÓN	16
1.1 Generalidades.	16
1.2 Estructura genómica de los herpesvirus.	17
1.3 Ciclo de replicación del virus.	19
1.4 Características de la infección producida por herpesvirus	23
Evasión de la respuesta inmune.	23
Evasión del sistema inmune no específico.	24
Evasión del sistema inmune adquirido.	25
Latencia y reactivación de los Alphaherpesvirus.	25
1.5 Equid Herpesvirus 1 (EHV-1)	27
Organización genómica.	27
Epidemiología Molecular.	29
La infección por EHV-1 en el huésped natural y en el modelo experimental.	31
1.6. Estudios Evolutivos.	35
Sistemática Filogenética.	35
Datos moleculares.	37
Topologías.	37
Métodos de distancia.	39
Máxima Parsimonia.	42
Criterios de optimalidad.	43
Pesado de caracteres.	45
Máxima verosimilitud.	47
	3

Modelos evolutivos.	49
Búsqueda de los árboles de longitud mínima.	49
Medidas de soporte y confianza.	51
Críticas a los principales métodos de reconstrucción filogenética.	51
Historia evolutiva de los estados de caracteres.	52
1.7. Hipotesis General.	55
1.8. Objetivos.	55
2. MATERIALES Y MÉTODOS.	56
2.1. Estudios genómicos de cepas de EHV-1	56
2.1.1. Cepas virales y multiplicación.	56
2.1.2 Extracción del ADN.	58
2.1.3. Estudio con enzimas de restricción.	58
2.1.4. Amplificación mediante reacción en cadena de la polimerasa del sector genómico en estudio.	58
2.1.5. Purificación del ADN amplificado.	60
2.1.6. Secuenciación de los fragmentos del ADN purificado.	60
2.2. Estudios de virulencia.	60
2.2.1. Animales.	60
2.2.2. Cepas virales.	61
2.2.3. Inoculación experimental y seguimiento clínico.	
2.2.4. Toma de muestras para aislamiento viral (AV), estudios histológicos (H) y detección de ADN viral por PCR.	61
2.2.5. Determinación de la viremia.	62
2.2.6. Detección de ADN viral por PCR.	62
2.2.7. Aislamiento viral.	62
2.2.8. Estudios histológicos.	63
Hematoxilina-Eosina.	63
Ácido periódico-Schiff (PAS)-Hematoxilina.	63
Técnica de Giemsa.	64
Lectininmunohistoquímica.	64
Inmunohistoquímica.	65
2.2.9. Recuentos celulares.	66

2.3. Análisis de las secuencias amplificadas.	66
3. RESULTADOS.	68
3.1. Estudios genómicos de cepas de EHV-1.	68
3.2. Estudios de virulencia.	68
Inoculación experimental y seguimiento clínico.	68
Determinación de viremia Aislamiento viral y detección de ADN viral por PCR.	69
Estudios histológicos.	69
3.3. Análisis de las secuencias amplificadas.	71
3.3.1. Caracterización genética.	72
3.3.2. Análisis Filogenético.	72
Análisis por Parsimonia.	72
Máxima Verosimilitud.	73
Cálculo de valores de confianza.	74
Mapeo de caracteres no moleculares.	75
4. DISCUSIÓN.	76
Estudios de virulencia.	77
Caracterización genética.	81
Análisis Filogenético.	82
Mapeo de caracteres no moleculares.	83
5. CONCLUSIONES GENERALES.	86
6. APÉNDICE.	87
7. BIBLIOGRAFÍA.	135

ABREVIATURAS.

μ g=Microgramo/s

μ l= Microlitro/s.

μ M= micromolar.

A= Adenina

ADN= Ácido desoxirribonucleico.

ARN= Ácido ribonucleico.

C= Citosina.

CMH-I= Complejo mayor de histocompatibilidad tipo I.

DICT50= Dosis infectiva 50% en cultivo de tejidos.

Dntp= Mezcla de partes iguales de los cuatro nucleótidos trifosfato (Adenina, Timina, Citocina, Guanina).

ECP= Efecto citopatogénico.

EDTA= Ácido Etilen Diamino Tetraacético.

EHV-1= Herpesvirus Equino 1.

EHV-4= Herpesvirus Equino 4.

G= Guanina.

GMG= Células granulares glandulares metriales

gp= Glicoproteína.

GT= Ganglio trigémino.

HH3= Herpesvirus Humano 3.

HSV-1= Herpes Simplex virus 1.

ICTV= Comité Internacional de Taxonomía de Virus

IF= Factor de iniciación.

IFN= Interferones.

Indels=Inserciones/deleciones (en un alineamiento nucleotídico)

IR= Región intergénica.

IRs= Repetición invertida inicial de la región corta.

Kbp= Kilopares de bases.

LAT= Transcriptos asociados a latencia.

LHQ= Lectininmunohistoquímica.

MEM= Medio esencial Mínimo.

mg= Miligramo
ml= Mililitro.
mM= Milimolar.
ng= Nanogramos.
NK= Células *natural killers*.
nt= Nucleótidos.
OG= Outgroup.
ORF= Marco abierto de lectura.
OTUs= Unidades taxonómicas operativas.
PCR= Reacción en cadena de la polimerasa
pi= Posinfección.
PKR= Proteína quinasa.
RE= Retículo endoplasmático.
SNC= Sistema nervioso central.
T= Timina.
Th1= Linfocitos T *helpers*
Ti= Transiciones.
TRs= Repetición invertida terminal de la región corta.
Tv= Transversiones.
Ul= Región larga.
Us= Región corta.

RESÚMEN.

El *Equid Herpesvirus tipo 1* (EHV-1) es un miembro del género *Varicellovirus*, el cual pertenece a la subfamilia *Alphaherpesvirinae*, familia *Herpesviridae*. Se encuentra distribuido en todo el mundo y las enfermedades causadas por este virus ocasionan importantes bajas en establecimientos de cría equina. La infección por EHV-1, genera signología respiratoria y nerviosa, abortos y síndrome neonatal caracterizado por la muerte del potrillo por lo general en las primeras 48 horas del nacimiento. Como todos los herpesvirus produce infecciones latentes. Desde los pulmones el virus se distribuye mediante una viremia asociada a células, llega así al útero donde provoca abortos o muerte perinatal, tanto en infecciones primarias como en reactivaciones debidas a inmunosupresión. Si bien el establecimiento de la viremia asociada a células es un factor necesario para que ocurra el aborto, también está relacionado a la dosis viral infectante y a la virulencia de la cepa y al sistema inmune del hospedador actuante. La asociación entre la viremia asociada a células y la diseminación del virus hasta el sitio de replicación secundaria (útero preñado, sistema nervioso central, etc) es crítica para comprender la patogénesis de la enfermedad. La interacción entre los leucocitos y las células endoteliales parece ser dependiente del tejido, sugiriendo la intervención de otros factores como los hormonales. El endoteliotropismo de la cepa determina el grado de trombosis que conduce a la isquemia placentaria y al grado de lesión en el sistema nervioso central. No siempre el feto expulsado está infectado y en caso de cepas menos endoteliotrópicas, las lesiones son menores y el virus alcanza a atravesar la placenta produciendo el aborto de un feto infectado. A pesar que la infección primaria genera una respuesta inmune humoral y la producción de anticuerpos neutralizantes, los animales no desarrollan inmunidad duradera contra el EHV-1, siendo susceptibles a la reinfección. La mayoría de las investigaciones relacionadas al potencial abortigénico y virulencia y endoteliotropismo de cepas de EHV-1 se realizan en el ratón BALB/C (*Mus musculus*), modelo experimental que evita utilizar al huésped natural de infección.

El genoma de EHV-1, de aproximadamente 150 kbp, esta compuesto por una doble cadena de ADN lineal integrada por dos regiones covalentemente ligadas, una denominada L y otra S flanqueadas por secuencias repetidas. El genoma del virus codifica alrededor de 30 proteínas estructurales de las cuales seis corresponden a glicoproteínas mayores. Estas glicoproteínas juegan un rol fundamental en la infectividad y la virulencia y son los principales blancos del sistema inmune. Las

regiones codificantes de EHV-1 contienen más de 99 codones y existen además cinco regiones no codificantes de tamaño variable. Una de ellas, denominada región intergénica (IR) se encuentra ubicada entre el ORF 62 y el ORF 63 y en el análisis molecular por enzimas de restricción se encuentra comprendida en los fragmentos *Bam*HI “e” y/o *Bgl*II”m”. Las modificaciones genómicas de esta región tendrían un rol fundamental en la virulencia y en el crecimiento viral.

Este trabajo de tesis consta de dos partes fundamentales: la primera de ellas pretende relacionar la estructura genómica de las cepas de EHV-1 con variaciones en su virulencia, utilizando el modelo experimental BALB/C. La segunda parte está dirigida a establecer hipótesis sobre las relaciones filogenéticas que reflejen la evolución de cepas argentinas de EHV-1 basando el estudio en la constitución genómica de la IR.

Estudios con enzimas de restricción. Se analizaron 22 cepas argentinas utilizando enzimas de restricción, la mayoría de las cepas presentaron pequeñas variaciones de movilidad en el fragmento *Bam*HI “e” y *Bgl*II “m” correspondiente a la IR. Esta región genómica fue amplificada por reacción en cadena de la polimerasa y posteriormente se secuenciaron los productos de las reacciones.

Estudios de virulencia. Las cepas denominadas AR2, AR3 y AR8 que presentaron diferencias genómicas más marcadas fueron seleccionadas y se estudiaron desde el punto de vista patogénico en ratonas preñadas BALB/C que fueron inoculadas por vía intranasal con cada una de las cepas. Todos los animales desarrollaron signos clínicos, disminuyeron su peso corporal en los días posinfección y se aisló virus de los úteros preñados. Con los datos que se obtuvieron no pudieron observarse mayores diferencias que permitieran determinar mayor o menor virulencia de las mismas.

En el pulmón en todos los animales inoculados con las diferentes cepas se observaron evidencias histológicas de infección en los cortes teñidos con hematoxilina-eosina, las mismas incluyeron: infiltrado inflamatorio, pérdida de la arquitectura alveolar normal, necrosis del epitelio alveolar y bronquial y presencia de cuerpos de inclusión intranucleares.

Los cambios histológicos encontrados en los úteros de los animales inoculados con las distintas cepas fueron muy heterogéneos. Se encontraron órganos con endometritis, otros con ligera congestión y edema y algunos no presentaron alteraciones detectables. Los úteros de los ratones inoculados con la cepa AR2, presentaron gran cantidad de células apoptóticas en el tejido conectivo, en la luz y las glándulas, cuerpos apoptóticos y descamación del epitelio. En algunos cortes pudieron observarse

abundante cantidad de macrófago, de focos de necrosis y de leucocitos polimorfonucleares. La inoculación de la cepa AR3 indujo muerte celular en el útero, sin embargo, la placenta y la decidua fueron de apariencia normal. Las ratonas inoculadas con la cepa AR8 presentaron abundante cantidad de neutrófilos y reabsorción con zonas de necrosis evidentes. La placenta presentó apariencia normal en la mayoría de los casos, sin embargo en algunos de los animales se detectaron áreas con leucocitos polimorfonucleares abundantes y congestión. No se encontró una relación importante entre el grado de las lesiones y la detección de virus por aislamiento viral y reacción en cadena de la polimerasa en los úteros de las ratonas infectadas. No se encontraron cambios cuantitativos en las células *Natural Killer* y en los mastocitos de los animales infectados. Las lesiones uterinas, halladas en la presente tesis no se habían descrito previamente en el ratón pero son comunes en el equino.

Caracterización genómica. El análisis genómico demostró un alto porcentaje de identidad de la IR de las cepas. En trece cepas argentinas (AR8, AR7, AR4, AR2, AR3, AR10, AR9, AR18, AR20, AR15, AR19, AR21, AR22) se encontraron inserciones de 18 bp ubicadas en las posiciones en la posición 109168 bp, mientras que en la cepa AR6 se encontró una inserción de 9 bp en la misma posición.

Caracterización genética de las cepas argentinas. Las cepas estudiadas han sido clasificadas utilizando técnicas de similitud global y el análisis de distancias genéticas reveló que 7 cepas se agrupan con las cepas extranjeras. Dentro de este grupo se ha podido identificar un subgrupo formado por una cepa argentina y una británica (ambas no productoras de signos neurológicos). No se observó relación entre el año de aislamiento ni el origen geográfico de las cepas.

Análisis filogenético. Los dendrogramas construidos a partir de similitudes globales suelen no corresponderse con la historia evolutiva del grupo en estudio. Por este motivo se aplicaron los métodos de parsimonia y máxima verosimilitud para reconstruir la historia evolutiva de las cepas de EHV-1. De acuerdo a nuestros resultados las cepas argentinas AR11, AR12, AR13, AR14, AR16 y AR17 junto con las cepas británicas UK1 y UK2, la cepa japonesa JA y la cepa norteamericana US se agrupan juntas, por lo cual pueden considerarse un grupo monofilético. Esto nos indica que las mismas tienen un ancestro común más cercano y este resultado está soportado por altos valores de soporte. Dentro de este grupo se pueden identificar a los grupos formados por las cepas británicas UK1 y UK2 las cuales constituyen un grupo monofilético al igual que el grupo formado por las cepas AR12 y AR16. La relación de

estos grupos con el resto de las cepas no ha podido ser establecido en este estudio. Según nuestro análisis las cepas analizadas en este trabajo constituyen un grupo polifilético lo que podría estar relacionado al continuo de animales desde países donde EHV-1 es común. Sin embargo, considerando que las cepas extranjeras son escasas, estas cepas podrían también ser polifiléticas y pueden haber evolucionado anidadas dentro de las cepas argentinas.

Evolución de los signos clínicos. El mapeo del carácter signos clínicos indica que la que la signología enfermedad neonatal, enfermedad respiratoria y enfermedad neurológica causada por EHV-1 no está relacionada con la evolución histórica del virus. Nuestro análisis sugiere que: a) la condición aborto es ancestral en las cepas de EHV-1, mientras que la condición enfermedad neonatal se desarrolló de manera independiente mediante evolución convergente; b) las diferencias en la signología observada causada por EHV-1 puede constituir un mecanismo de adaptación del virus a diferentes presiones ambientales de los tejidos. Los factores que pueden actuar como diferentes presiones ambientales del hospedador pueden ser las diferentes células infectadas, las diferentes poblaciones de anticuerpos activos presentes en distintos tejidos y las condiciones físico-químicas. Estos factores al actuar como diferentes presiones de selección, pueden incrementar la frecuencia de las variantes genéticas más eficientes en las nuevas condiciones ambientales. Este estudio constituye el primer análisis realizado en Sudamérica con cepas de EHV-1 para establecer las relaciones filogenéticas existentes entre las cepas así como para reconstruir la historia evolutiva de los signos clínicos, basado en el método de parsimonia. Desde los puntos de vista clínico, inmunológico y virológico, la posibilidad de que un virus ocupe distintos nichos (ej: tracto respiratorio, sistema nervioso, sistema reproductivo) plantea nuevos aspectos a tener en cuenta. En primer lugar, la inmunidad de los distintos sistemas varía, y por lo tanto también lo hace la patogenia de la enfermedad, esto sugiere que una vacuna efectiva contra la infección en alguna de sus localizaciones anatómicas no necesariamente será efectiva para otra.

ABSTRACT.

Equid Herpesvirus type 1 (EHV-1) is a member of the genus *Varicellovirus*, which belongs to the subfamily *Alphaherpesvirinae*, and the family *Herpesviridae*. It is distributed worldwide and causes diseases that lead to significant losses in equine breeding facilities.

The infection by EHV-1 generates respiratory and nervous symptoms, abortions and neonatal syndrome characterized by the death of the foal, usually within the first 48 hours from birth. As all herpesviruses, this virus produces latent infections. The virus distributes from the lungs by means of a viremia associated with cells, until it reaches the uterus, where it causes abortions or perinatal death, both in primary infections and in reactivations due to immunosuppression. Although the establishment of the viremia associated with cells is a necessary factor for the abortion to occur, it is also related to the infective viral dose and the virulence of the strain as well as to the immune system of the host.

The association between the viremia associated with cells and the dissemination of the virus up to the secondary replication site (pregnant uterus, central nervous system, etc) is critical to understand the pathogenesis of the disease. The interaction between leukocytes and endothelial cells seems to be dependent on the tissue, thus suggesting the involvement of other factors such as hormonal ones. The endotheliotropism of the strain determines the degree of thrombosis that leads to placental ischemia and the degree of the lesion in the central nervous system. The expelled fetus is not always infected, and when the strains are less endotheliotropic, the lesions are not as severe and the virus goes through the placenta, thus producing the abortion of the infected fetus.

Although the primary infection generates a humoral immune response and the production of neutralizing antibodies, the animals do not develop long-term immunity against EHV-1, and are thus susceptible to reinfection.

Most works on the abortigenic potential, virulence and endotheliotropism of the EHV-1 strains have been carried out in BALB/C mice (*Mus musculus*), an experimental model that allows avoiding the use of the natural host of the infection.

The EHV-1 genome, which is of approximately 150 kbp, is composed of a double strand of linear DNA integrated by two covalently attached regions, one denominated L and another one denominated S, flanked by repeated sequences. The

viral genome encodes for about 30 structural proteins, six of which correspond to larger glycoproteins. These glycoproteins play a key role in the infectivity and virulence and are the main targets of the immune system. The EHV-1 has both a coding region that contains more than 99 codons and five non-coding regions of variable size. One of them, known as the intergenic region (IR), is located between ORF 62 and ORF 63, and when it is molecularly analyzed by restriction enzymes it is between fragments *Bam*HI “e” and/or *Bgl*II “m”. The genomic modifications of this region seem to have a key role in the virulence and growth of the virus.

This thesis work consists of two main parts: the first, which aims to relate the genomic structure of EHV-1 strains with variations in its virulence, using BALB/C mice as experimental model; and the second, which aims to establish a hypothesis about the phylogenetic relations that reflect the evolution of the Argentinian strains of EHV-1, basing the study on the genomic constitution of the IR.

Studies with restriction enzymes. A total of 22 Argentinian strains were analyzed using restriction enzymes. Most of the strains presented mobility variations in the *Bam*HI “e” and *Bgl*II “m” fragments corresponding to the IR. This genomic region was amplified by polymerase chain reaction and the products of the reactions then sequenced.

Virulence studies. The strains denominated AR2, AR3 and AR8 that presented more marked genomic differences were selected and pathogenically studied in BALB/C pregnant mice inoculated intranasally with each of the strains.

All the animals developed clinical signs, decreased their body weight after the infection and the virus was isolated from the uteri. The results did not allow the determination of either higher or lower virulence of any of the strains.

All the animals inoculated with the different strains presented histological evidences of infection in the lung sections stained with hematoxylin-eosin. These evidences included: inflammatory infiltrate, loss of the normal alveolar architecture, necrosis of the alveolar and bronchial epithelium and the presence of intranuclear inclusion bodies.

The histological changes found in the uteri of the animals inoculated with the different strains were very heterogeneous: some organs presented endometritis, other organs presented light congestion and edema, and others did not present any detectable alteration.

The uteri of the mice inoculated with strain AR2 presented a large number of apoptotic cells in the connective tissue, in the lumen and glands, apoptotic bodies and desquamation of the epithelium. In some sections it was possible to observe a large number of macrophages, necrosis foci and polymorphonuclear leukocytes. Although the inoculation of strain AR3 induced cell death in the uterus, the placenta and the decidua presented a normal appearance.

The mice inoculated with strain AR8 presented a large number of neutrophils and a great reabsorption with necrotic areas. Although the placenta presented a normal appearance in most cases, some of the animals showed areas with abundant polymorphonuclear leukocytes and congestion.

No significant relationship was found between the degree of the lesions and the detection of the virus by viral isolation and polymerase chain reaction in the uteri of the infected mice. Besides, no quantitative changes were found in *Natural Killer* cells and mastocytes of the infected animals. Although the uterine lesions had not been previously described in mice, they are common in equines.

Genomic characterization. The genomic analysis showed a high percentage of identity of the IR of the strains. Thirteen of the Argentinian strains (AR8, AR7, AR4, AR2, AR3, AR10, AR9, AR18, AR20, AR15, AR19, AR21 and AR22) presented 18-bp insertions located in position 109168 bp, whereas strain AR6 showed a 9-bp insertion in the same position.

Genetic characterization of the Argentinian strains. The strains studied were classified using global similarity techniques and the analysis of genetic distances revealed that seven strains clustered with foreign strains. Within this group, it was possible to identify a subgroup formed by an Argentinian strain and a British strain (neither of them producing neurological signs). Besides, no relationship was observed between the year of isolation and the geographical origin of the strains.

Phylogenetic analysis. The dendrograms constructed from the global similarities did not seem to correspond to the evolutionary history of the group under study. Therefore, parsimony and maximum verosimilarity methods were applied to reconstruct the evolutionary history of EHV-1 strains.

According to our results, the Argentinian strains AR11, AR12, AR13, AR14, AR16 and AR17, together with the British strains UK1 and UK2, the Japanese strain JA, and the American strain US, are clustered together, for which they could be considered a monophyletic group. This indicates that they have a closer common

ancestor, a fact supported by the high support values. Within this group, it was possible to identify the groups formed by the British strains UK1 and UK2, which constitute a monophyletic group, as well as the one formed by the AR12 and AR16 strains. However, it was not possible to establish the relationship between these groups and the remaining strains.

According to our analysis, the strains analyzed in this work constitute a polyphyletic group, which could be related to the continuous importation of animals from countries where EHV-1 is common. However, considering that the foreign strains are scarce, these strains could also be polyphyletic and may have evolved nested inside the Argentinian strains.

Evolution of clinical signs. The mapping of clinical signs indicates that the symptomatology caused by EHV-1 is not related to the historical evolution of the virus. Our analysis suggests that: a) the abortion is ancestral in EHV-1 strains, whereas the neonatal disease developed independently by means of a convergent evolution; b) the differences observed in the symptomatology caused by EHV-1 may constitute an adaptation mechanism of the virus to different environmental pressures in the tissues.

The factors that can act with different environmental pressures to the host can be the different infected cells, the different populations of active antibodies present in different tissues and the physico-chemical conditions. These factors act as different selection pressures and can thus increase the frequency of the most efficient genetic variants in the new environmental conditions.

This study constitutes the first analysis carried out in South America with EHV-1 strains aimed to establish the phylogenetic relations between strains and to reconstruct the evolutionary history of the clinical signs, based on the parsimony method.

From the clinical, immunological and virological points of view, the possibility that a virus occupies different niches (such as the respiratory, nervous or reproductive system) represents a new aspect that should be taken into account. The fact that the immunity of the different systems varies, and so does the pathogenicity of the disease, suggests that an effective vaccine against the infection in some of its anatomic localizations will not necessarily be effective for another.

1. Introducción



1. INTRODUCCION

1.1. GENERALIDADES.

El *Equid Herpesvirus tipo 1* (EHV-1) es un miembro del género *Varicellovirus*, el cual pertenece a la subfamilia *Alphaherpesvirinae*, familia *Herpesviridae*. Dentro de este género se reconocen 17 especies, entre ellas: *Equid Herpesvirus tipo 1*, *Equid Herpesvirus tipo 4*, *Bovine Herpesvirus*, *Human Herpesvirus 3*.

La familia *Herpesviridae* está constituida por virus de estructura muy similar, capaces de producir infecciones latentes, que infectan a diversos miembros del Reino Animalia (Roizman et al., 1985).

El *International Committee on Taxonomy of Viruses* (ICTV) reconoce, en base a su ciclo de replicación, crecimiento en cultivos celulares y al órgano en el que producen latencia, tres subfamilias dentro de la familia *Herpesviridae*: *Alphaherpesvirinae*, *Betaherpesvirinae* y *Gammaherpesvirinae*.

A continuación se describen las principales características de cada subfamilia y los géneros que las integran (ICTV, www.ncbi.nih.gov/ICTVdb/Ictv/index.htm)

Subfamilia Alphaherpesvirinae.

Los integrantes de esta familia se caracterizan por presentar un amplio rango de hospedadores, un ciclo viral relativamente corto, una rápida diseminación en cultivo de tejidos, una alta eficiencia en la destrucción de células infectadas (efecto citopatogénico –ECP- lítico) y la capacidad de establecer latencia en las neuronas de los ganglios sensoriales. La latencia genera un reservorio de virus y la posibilidad de desarrollo de enfermedades neurológicas severas. Esta subfamilia incluye a los géneros *Varicellovirus*, *Simplexvirus*, *Mardivirus* (denominado previamente *Marek's disease-like virus*) e *Itovirus* (denominado *infectious laryngotracheitis-like virus*).

Subfamilia Betaherpesvirinae.

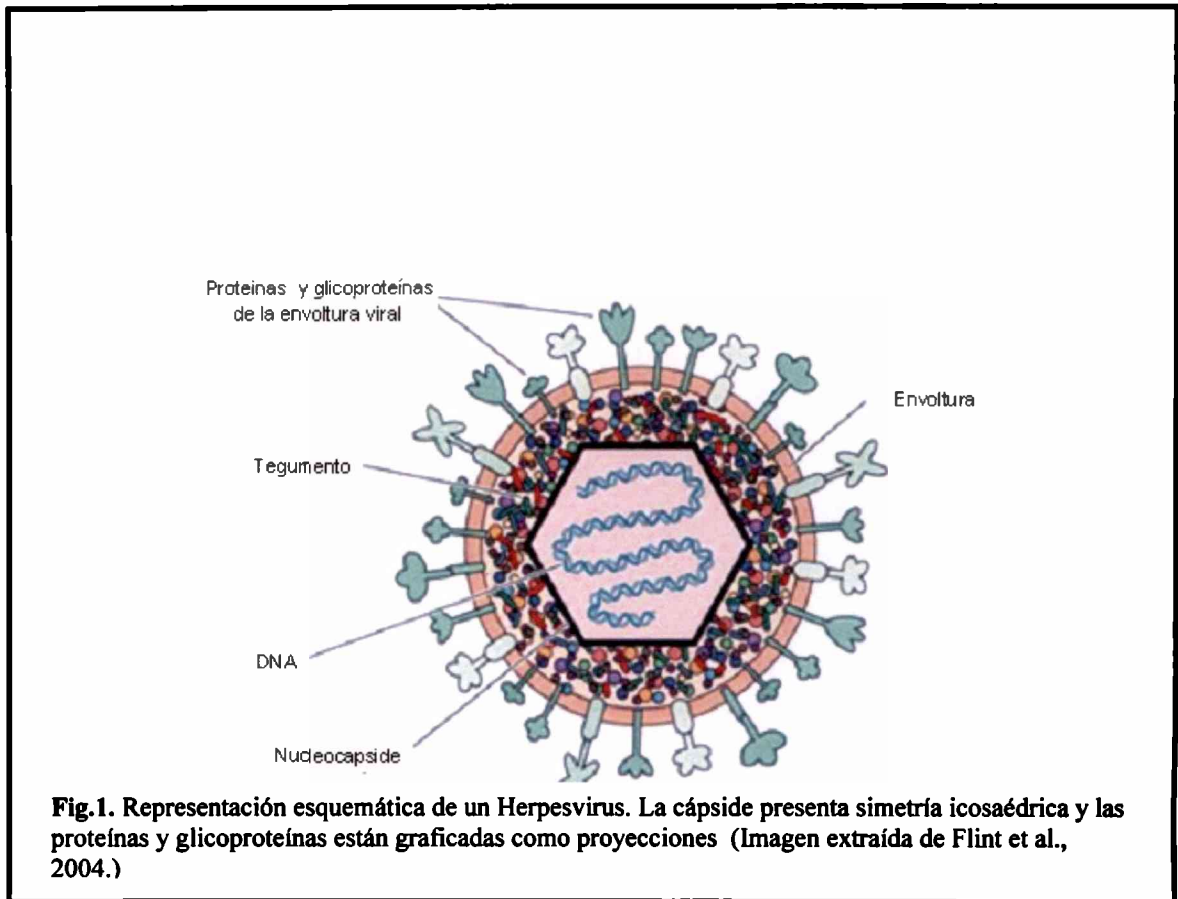
Los miembros de esta subfamilia poseen un rango restringido de hospedador. Su ciclo viral es largo y su diseminación en cultivo es lenta. El virus puede mantenerse en estado de latencia en glándulas secretorias, células linfocitoculares, riñones, etc. Los géneros incluidos en esta subfamilia son *Cytomegalovirus*, *Muromegalovirus* y *Roseolovirus*.

Subfamilia Gammaherpesvirinae.

Todos los miembros de esta subfamilia replican *in vitro* en células linfoblásticas y algunos causan infecciones líticas en células epiteloides y fibroblásticas. El rango de hospedador de los integrantes de esta subfamilia está limitado a la familia u orden a la que pertenece el hospedador natural. Son específicos de linfocitos T y B y se ha demostrado latencia en tejidos linfoides. Esta subfamilia incluye solo dos géneros: *Lymphocryptovirus*, *Rhadinovirus*.

1.2. ESTRUCTURA GENÓMICA DE LOS HERPESVIRUS.

El genoma de los integrantes de la familia *Herpesviridae* consiste en una única molécula lineal de ADN de doble cadena que se presenta enrollada alrededor de una estructura proteica toroidal. Codifica entre 30 y 35 proteínas estructurales y más de 70 proteínas en la célula infectada. Los viriones son envueltos, la cápside es icosaédrica, de simetría cúbica y está constituida por 162 capsómeros. Alrededor de la nucleocápside se encuentra una capa amorfa fibrosa y asimétrica denominada tegumento, que está compuesta por lipoproteínas, glicoproteínas y proteínas con actividad enzimática. La envoltura externa es de naturaleza lipoproteica, trilaminar y posee proyecciones glicoproteicas denominadas espículas o peplómeros (Roizman et al., 1992; Berria, 1998) (Figura 1).



El genoma posee secuencias repetidas tanto internas como terminales que pueden variar en el número de copias, por lo que existen variaciones del tamaño del genoma de hasta 10 kbp. El estudio de la organización del genoma viral otorga un criterio de clasificación diferente de los *Herpesvirus*, esta nueva clasificación se presenta en la Figura 2. Sobre la base de este criterio de clasificación el EHV-1 ha sido incluido en el grupo D conjuntamente con *Equid Herpesvirus tipo 4* (EHV-4), *Bovine Herpesvirus* (BoHV), *Human Herpesvirus 3* (HHV-3).

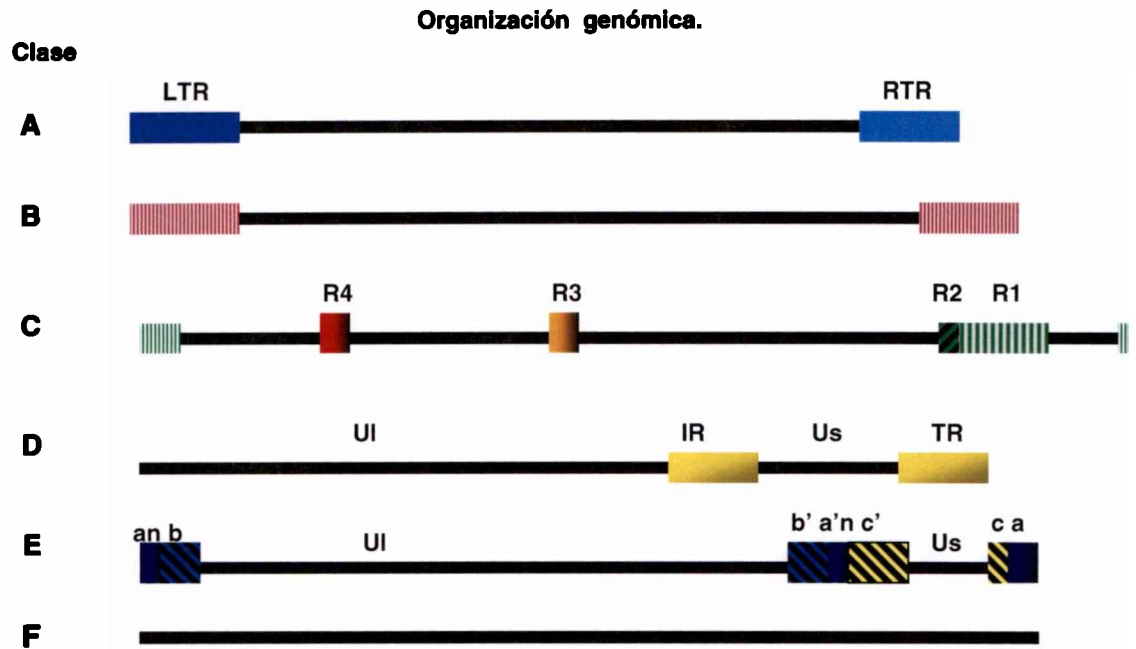


Fig. 2 Esquema de la organización genómica de los seis grupos establecidos para los miembros de la Familia *Herpesviridae*. Los genomas A, B, C, D, E, y F están representados por herpesvirus de *channel catfish*, Herpesvirus saimiri, virus Epstein-Barr, virus Varicella-zoster, virus Herpes Simplex y Herpesvirus tupaia, respectivamente. En el esquema las líneas horizontales representan regiones únicas o casi únicas. Las regiones repetitivas están representadas por rectángulos y designadas como repeticiones terminales izquierda y derecha (LTR Y RTR) para el grupo A, repeticiones internas R1 y R4 para el grupo C, e interna terminal para el grupo D. Los extremos del grupo E (HSV-1) consisten de dos elementos. Uno de los extremos contiene n copias de la secuencia “a” al lado de una secuencia más larga denominada “b”, el otro extremo posee una secuencia “a” seguida de una secuencia denominada “c”. Las secuencias terminales “ab” y “ca” están insertadas en orientaciones invertidas (marcadas con comillas) de modo de separar la región única en un dominio largo (UL) y uno corto (US). Las repeticiones terminales de los genomas de tipo F aún no han sido descritas. En el grupo B, las secuencias terminales están reiteradas en varias ocasiones en ambos extremos. El número de repeticiones puede ser diferente en cada extremo. Los componentes de los genomas D y E pueden invertir su posición. En los genomas de clase D, el componente corto (US) se invierte en relación al largo (UL). Aunque con muy frecuencia, el segmento largo podría invertirse, la mayoría de las moléculas de ADN forman dos poblaciones que difieren en la orientación del componente corto. En los genomas E, tanto el componente largo como el corto pueden invertirse por lo tanto el ADN viral consiste en cuatro isómeros equimolares. (Modificado a partir de Roizman et al, 1992).

1.3. CICLO DE REPLICACIÓN VIRAL.

El ciclo de multiplicación de los Herpesvirus se resume en las siguientes etapas (Figura 3)

a) Adsorción: ocurre en receptores específicos de la membrana de la célula huésped con intervención de glicoproteínas virales. Esta etapa ocurre en tres fases. La primera involucra la unión lábil entre las glicoproteínas virales (gB y gC) y los glicosaminos de las membranas celulares (Shuckla et al., 2000). Luego se produce la unión entre la glicoproteína D (gD) a un receptor celular (herpesvirus *entry mediator A*, *HveA*, *BEV*,

HveC, *HveD* y *3-O sulfated heparan sulfate 3-O-S HS*) (Spear et al., 2000, 2003). Finalmente, la fusión de las membranas (envoltura viral con membrana celular) lleva a la entrada definitiva del virión.

b) Penetración: acontece por fagocitosis o, más frecuentemente, por fusión de la membrana plasmática con la envoltura viral. Van de Walle et al., (2008) demostraron la importancia del primero de los mecanismos mencionados para el ingreso de EHV-1 en cultivos celulares.

c) Decapsidación: se caracteriza por la liberación del ADN viral en el núcleo. Este evento se produce gracias a la acción de todos los componentes del virión que protegen y facilitan la entrada del ADN viral y permiten la síntesis de macromoléculas en la célula hospedadora. El mecanismo de transporte de la nucleocápside hacia el núcleo celular es un proceso poco conocido. La proteína del tegumento UL34, asociada a la cápside, se une a la dineína de los microtúbulos y cataliza el desplazamiento hacia el núcleo (Ye et al., 2000). El ingreso del ADN viral al núcleo ocurre a nivel de los poros nucleares. Cuando ingresa al núcleo, el ADN se circulariza sin necesidad de expresión de proteínas virales (Garber et al., 1993).

d) Transcripción del ADN viral: ocurre por acción de la ARN polimerasa II de la célula. Se producen tres clases de ARNm de manera secuencial y en cascada, estos se traducen para la biosíntesis de 3 tipos de proteínas. Las primeras y segundas proteínas formadas (α y β) actúan como reguladoras y desencadenan la biosíntesis del tercer tipo de proteínas (γ) que son estructurales y forman las cápsides. La transcripción del ADN viral comienza en el núcleo por acción de la enzima ARN polimerasa II de la célula hospedadora. La expresión de los genes está regulada por un sistema de “*on- off*” que activa e interrumpe la lectura secuencial de los genes. De esta manera, se pueden distinguir tres grupos de genes dependiendo del momento de la infección en que se expresan, los genes α o genes inmediatos tempranos (*immediate early*, IE), los genes β o genes tempranos (*early*, E) y los genes γ o genes tardíos (*late*, L). A partir del momento en el que el ADN viral ingresa al núcleo, algunas proteínas del tegumento interactúan con los componentes transcripcionales celulares para estimular la transcripción de los genes α que activarán la expresión de los genes β y γ . Las proteínas codificadas por los genes β presentan su pico máximo de expresión entre las 4 y 8 hs posinfección (pi). Estas proteínas están implicadas en el metabolismo de los nucleótidos y en los eventos ligados a la replicación del ADN viral. En los genes γ pueden distinguirse dos grupos:

los genes $\gamma 1$ tardíos precoces, que presentan un aumento en su expresión debido a la síntesis del ADN viral; y los $\gamma 2$, o tardíos propiamente dichos, en los cuales la expresión es completamente dependiente de la síntesis de ADN viral. Las proteínas estructurales codificadas por los genes γ , se producen en gran cantidad en el citosol o en retículo endoplasmático (RE). Algunas de ellas migran hacia el núcleo donde se ensamblarán para formar las nuevas cápsides. Estos genes codifican para 11 glicoproteínas virales: gB, gD, gH, gK y gL, esenciales para lograr una infección productiva en tejidos y para la entrada de partículas virales extracelulares a las células; y gC, gE, gI, gG, gJ, gM y gN, consideradas como no esenciales (Davison, 2002).

e) Replicación del ADN: se realiza en el núcleo celular, adopta el sistema de círculo rodante y es semiconservativa con intervención de una ADN polimerasa específica codificada por el virus.

f) Armado del ADN: ocurre dentro de cápsides preformadas.

g) Maduración: acontece al asociarse las cápsides con áreas alteradas de la zona interna de la membrana nuclear de la célula huésped. La salida del núcleo viral ocurre por brotación a través de la membrana nuclear modificada de donde adquiere envoltura.

h) Pasaje y maduración: se produce en el RE en donde se glicosilan las principales proteínas de membrana.

i) Liberación de los viriones al medio extracelular por exocitosis o por citólisis.

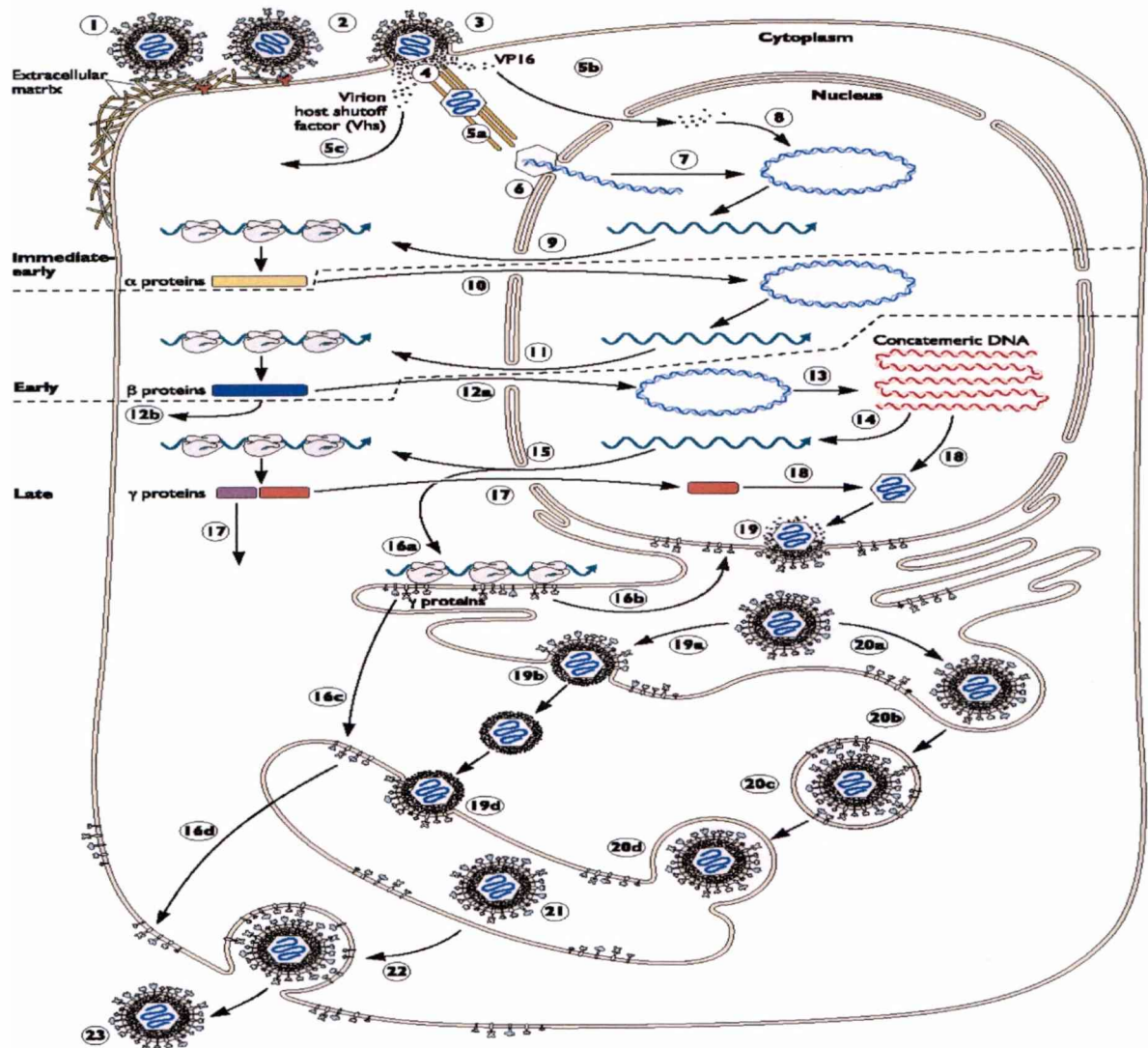


Fig. 3. Ciclo de multiplicación de un Herpesvirus: Glicoproteínas de la membrana viral (1). Interacción con receptores celulares (2) Fusión (3). Proteínas del tegumento y de la nucleocápside ingresan al citoplasma celular (4). Transporte de la nucleocápside (5a) y de proteínas activadoras de la transcripción (5b) hacia el núcleo. Proteínas del tegumento que permanecen en el núcleo (6). Entrada de la nucleocápside por el poro nuclear (7). Proteínas del tegumento activadoras de la transcripción (8). α ARNm son transportados hacia el citoplasma (9) donde se sintetizan las α proteínas (10) reguladoras de la síntesis del β ARNm (11) para la síntesis de las β proteínas (12). Inicio de la síntesis del ADN viral (13). Síntesis de γ ARNm (14) y de γ proteínas (15) estructurales. Algunas γ proteínas precursoras quedan en el retículo endoplásmico rugoso (16a), otras se localizan sobre la membrana nuclear del lado interno del mismo (16b) o son trasladadas al aparato de Golgi para su posterior procesamiento (16c) y una vez maduras se depositan en la membrana plasmática de la célula infectada (16d). Algunas γ proteínas son transportadas hacia el núcleo para formar las cápsides y otras permanecen en el citoplasma (17). El ADN formado se empaqueta en las cápsides formadas (18) e inicia su paso a través de la membrana nuclear (19) en donde adquiere envoltura (20). Esta estructura es transportada hacia el aparato de Golgi en donde se completa la envoltura viral (21). La partícula viral completa (22) es transportada hacia la membrana plasmática y es liberada por exocitosis (23) (Imagen extraída de Flint et al., 2004)

1.4. CARACTERÍSTICAS DE LA INFECCIÓN PRODUCIDA POR *HERPESVIRUS*.

Los *Herpesvirus* se caracterizan por penetrar a través de piel o mucosas principalmente del tracto respiratorio superior, orofacial o genital. Luego de la primoinfección establecen infecciones latentes permaneciendo inaccesible al sistema inmune. Por diversos factores, generalmente inmunodepresión, el virus en estado latente reactiva, sale de su sitio de latencia y produce nuevas manifestaciones clínicas o subclínicas.

Los mecanismos moleculares y las funciones virales involucradas en cada paso de la infección y en el desarrollo de la enfermedad, son objeto de exhaustivas investigaciones. Los factores virales que alteran la viabilidad de una célula o del organismo hospedador, que ocasionan la enfermedad, son considerados factores de virulencia. Estos factores incluyen genes que codifican para glicoproteínas de la envoltura viral, enzimas involucradas en el metabolismo de nucleótidos o reparación del ADN y productos que afectan al mecanismo de apoptosis de las células del hospedador o las respuestas inmunológicas del mismo (Mettenleiter, 2002).

Evasión de la respuesta inmune.

La coexistencia de un virus y su hospedador inmunocompetente requiere, para la supervivencia de ambos, un balance entre el nivel de la replicación viral y la destrucción del virus por medio del sistema inmune. El sistema inmune del hospedador emplea una gran variedad de estrategias para eliminar virus, y éstos a su vez, han desarrollado una serie de mecanismos de evasión de la respuesta inmune de su hospedador con el objetivo de extender el período “ventana” para la replicación viral y la diseminación de las partículas virales (Vossen et al, 2002). Finalmente, el conjunto de factores virales responsables de la evasión del sistema inmune del hospedador permiten al virus persistir y establecer una infección latente, así como también, producir efectos deletéreos concomitantes a la inmunodepresión inducida por distintos efectos virales.

La respuesta inmune, tanto innata como adquirida, desarrollada por el hospedador frente a un virus tiene como objetivo limitar la infección viral y eliminar las células infectadas. Los mecanismos principales del sistema inmune inespecífico son la inhibición de la infección por los interferones de tipo I (IFN α/β) y la eliminación de las células infectadas por las células *natural killer*. La respuesta adquirida está constituida por los Ac que bloquean la unión del virus a la célula hospedadora y la entrada a ella y

por los linfocitos T citotóxicos, los cuales combaten la infección mediante la destrucción de las células infectadas (Del Médico Zajac, 2007).

Evasión del sistema inmune no específico.

La primera respuesta del hospedador frente a una infección viral consiste en la expresión y secreción de interferones (IFNs), lo que lleva a las células a un estado antiviral y contribuye a la inducción y regulación de la subsiguiente respuesta inmune antiviral. En particular los IFNs tipo I, (alfa y beta) inducen rápidamente el estado antiviral dentro de las células, por lo que los virus han desarrollado diversos mecanismos para evadir esa respuesta. Luego de la estimulación celular por IFN α/β , se sintetiza la proteína quinasa dependiente de ARN doble cadena (PKR). Siguiendo a la infección viral se produce la activación de PKR, ésta fosforila la subunidad α del factor de iniciación de la traducción IF2 α , y de esta manera, se bloquea la traducción del ARN viral en proteínas dentro de la célula hospedadora.

Un segundo mecanismo del sistema inmune innato, es el sistema del complemento. La vía alternativa consiste en una cascada regulada de reacciones que conducen a la destrucción de las células infectadas por la formación de un complejo de ataque a la membrana. La enzima clave para la activación de este sistema es la C3 convertasa. La glicoproteína C (gC) de diversos integrantes de la subfamilia *Alphaherpesvirinae*, interfiere sobre esta enzima en dos niveles. El primer mecanismo, encontrado en EHV-1 entre otros virus (Fries et al., 1986, Huemer et al., 1992, 1993, 1995), consiste en la asociación de la gC, a través de un dominio central con el fragmento C3b, que es componente esencial de la C3 convertasa (Friedman et al., 1984). El segundo mecanismo consiste en la interacción del dominio N-terminal de gC con una proteína sérica, la properdina, la cual interviene en la estabilización de la C3 convertasa. De esta forma, la gC acelera la degradación de la C3 convertasa al secuestrar la properdina (Hung et al., 1994).

Un nuevo modelo de inmunomodulación, ya conocido en los miembros de la familia *Poxviridae*, y en las restantes dos subfamilias de *Herpesviridae* (*Betaherpesvirinae* y *Gammaherpesvirinae*), se describió recientemente en los alphaherpesvirus. En este caso existe una interacción viral con el sistema de las quemoquinas, las cuales tienen un rol crucial en la organización de la respuesta inmune e inflamatoria (Del Médico Zajac, 2007). Los virus han desarrollado tres estrategias que

les permiten modular la acción de las quemoquinas: la secreción de quemoquinas homólogas agonistas o antagonistas, la síntesis de receptores homólogos y la secreción de proteínas solubles que se asocian a quemoquinas. La glicoproteína G (gG) de gran parte de los alphaherpesvirus, representa un ejemplo de la tercera estrategia. Esta glicoproteína, presente en la envoltura viral, tanto en su forma secretada como expresada a nivel de la membrana plasmática de células infectadas, posee la capacidad de asociar diversas quemoquinas. De esta forma, bloquea la interacción con su receptor celular e inhibe la transducción de señales y la migración celular inducida por dicha quemoquina. Este mecanismo ha sido demostrado *in vitro* en BoHV-1, BoHV-5, EHV-1 y *Equid Herpesvirus 3* (EHV-3), entre otros (Bryant et al., 2003).

Evasión del sistema inmune adquirido.

La propagación viral de célula a célula y el transporte axonal (retrógrado) permiten reducir al máximo la fase extracelular de los viriones y, de esta forma, se evade el reconocimiento por los efectores del sistema inmune.

El complejo gE-gI de HSV-1, puede actuar como receptor de la fracción Fc de los Ac circulantes (Nagashunmugam et al., 1998). De esta manera este complejo el virus captura los Ac a nivel de la envoltura viral o de la membrana de la célula infectada, generando un “aglomerado” de gran tamaño que juega un rol protector frente a las células inmunes. En EHV-1 no se han obtenido resultados concluyentes sobre la implicancia del complejo gE-gI en este proceso (Whitbeck et al., 1996).

En EHV-1 una proteína temprana del virus induce un aumento en la endocitosis de las moléculas CMH-I de la membrana celular (Rappocciolo et al., 2003).

Latencia y reactivación de los *Alphaherpesvirus*.

Los miembros de la subfamilia *Alphaherpesvirinae* poseen la capacidad de establecer latencia en neuronas y ganglios sensoriales (trigémico y sacro), aunque se ha demostrado la existencia de ADN viral en diversas regiones del SNC y tonsilas (Vogel et al., 2003). Durante el período de latencia, no se producen virus infecciosos y solo bajo ciertos estímulos esta situación será revertida, en esos casos se induce la reactivación y re-excreción del virus en el sitio inicial de la infección. Los procesos de latencia y reactivación son fundamentales para la virulencia y la patogenia de estos virus, dado que su genoma latente no puede ser eliminado del hospedador infectado

(Muylkens et al., 2003). Un hospedador con infección latente constituye un reservorio natural del virus.

Para explicar el ciclo de latencia- reactivación del virus podemos utilizar como ejemplo a HSV-1. Estudios realizados en esta especie sobre el ciclo latencia-reactivación permitieron dividirlo en tres pasos principales: establecimiento, mantenimiento y reactivación (Jones, 2003).

El establecimiento de la latencia ocurre durante la infección aguda y se produce cuando el genoma viral entra en una neurona sensorial. Luego, la expresión de los genes virales asociados al ciclo lítico es interrumpida, con excepción de una familia de genes de ARNs denominados *transcriptos asociados a latencia* (LAT).

La etapa de mantenimiento de la latencia dura toda la vida del hospedador y se define como el período en que no se detectan partículas virales infecciosas (por aislamiento viral) (Jones, 2003). El genoma viral “en latencia” está presente en forma de episoma circular (Rock & Fraser, 1983, 1985) y está asociado a histonas celulares (Deshmane et al., 1989). Durante esta etapa, todos los alphaherpesvirus expresan los LAT, con la única excepción de VZV, ya que en este virus el estado de latencia está acompañado a gran escala de la proteína inmediata temprana IE63. Existen dos grupos de LAT: uno de ellos es de gran tamaño (aproximadamente 8.5 kbp) y poliadenilado (Zwaagstra et al., 1990); los miembros del otro grupo son más abundantes y se producen por el *splicing* del transcripto de mayor tamaño, no poseen cap, no son poliadenilados y su tamaño varía entre 1.5 y 2 kbp (Krummenacher et al., 1997). Los LAT contienen varios marcos abiertos de lectura (ORFs) pequeños y se ha publicado la existencia de un antígeno asociado a la latencia (Doerig et al., 1991).

La etapa de reactivación se inicia luego de que ciertos estímulos externos (estrés e inmunosupresión) estimulan la expresión de genes virales. Aún no se ha definido si la neurona que realiza la reactivación sobrevive y mantiene la latencia, o si muere como consecuencia de la infección productiva del virus (Jones, 2003). La reactivación de los alphaherpesvirus produce enfermedades recurrentes y transmisión del virus a hospedadores susceptibles.

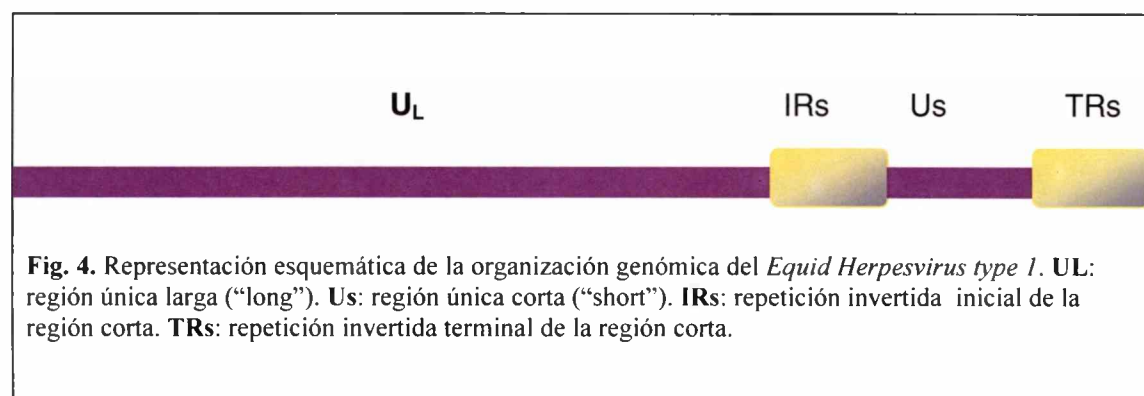
Diversos trabajos han demostrado la importancia de los LAT en el ciclo de latencia-reactivación (Jones, 2003, 2006). Se ha demostrado que los LAT aumenta el establecimiento de la latencia en ratones (Thompson & Sawtell, 1997) ya que al inocular estos animales con una cepa LAT- presentaron menores niveles de ADN viral en el ganglio trigémino (GT) (Maggioncalda et al., 1996). Asimismo, se observó que los

LAT reprimen los genes virales productivos en GT de ratones durante la infección aguda (Chen et al., 1997). Utilizando modelos de conejos (con infección ocular), se ha demostrado la importancia de los LAT en la reactivación ya que al inocularlos con la cepa mutante LAT- de HSV-1, se observó una gran inhibición de la reactivación (Perng et al., 2000). Por otra parte, se ha encontrado que los LAT interfiere con la apoptosis de células transfectadas (Ahmed et al., 2002) y que la interferencia con la apoptosis correlaciona con la habilidad de los LAT para inducir reactivación (Imman, et al., 2001). Estos datos sugieren que la actividad antiapoptótica de los LAT es importante durante el ciclo de latencia-reactivación. Esta hipótesis está sustentada por la observación de que los LAT promueven la supervivencia en neuronas del GT en conejos infectados (Perng et al., 2000).

1.5. *Equid Herpesvirus 1 (EHV-1)*.

Organización genómica.

El genoma tipo D de EHV-1 mide aproximadamente 150 kbp, su PM es 92×10^6 Da, posee un 56 % de G-C y su densidad de flotación en sucrosa y tartrato de potasio es de $1,18 \text{ g/cm}^3$. La doble cadena de ADN lineal está compuesta por dos regiones covalentemente ligadas, una denominada L (“long”) y otra S (“short”). La región única S se encuentra flanqueada por dos secuencias repetidas invertidas interna y terminal (IR_S y TR_S), de manera que puede invertirse respecto a la región L generando dos tipos isoméricos equimoleculares. La región L consiste en una única secuencia flanqueada por pequeñas repeticiones invertidas (Ibrahim et al., 2004) (Figura 4).



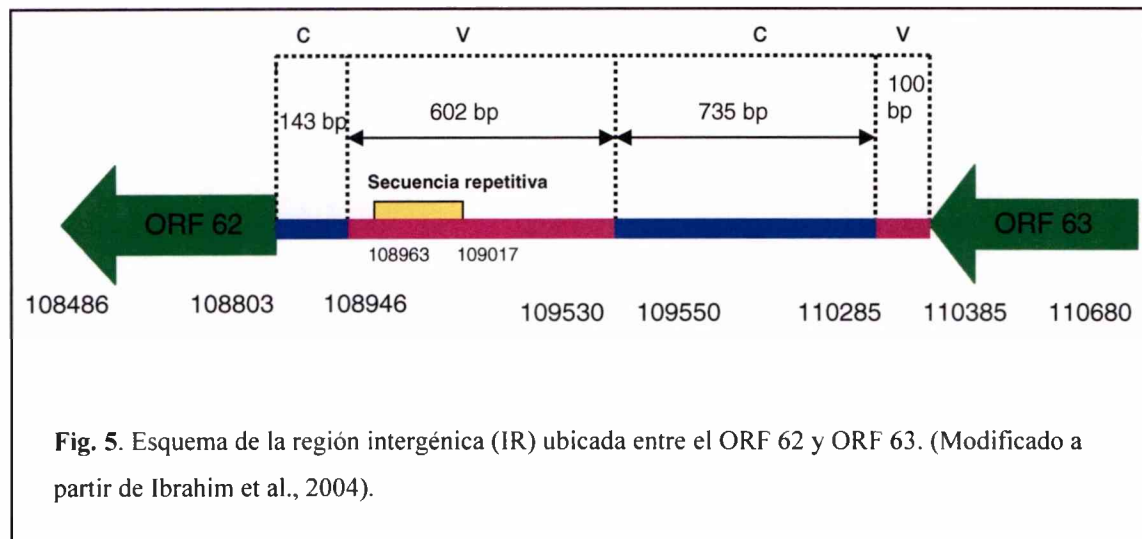
El genoma del virus codifica alrededor de 30 proteínas estructurales de las cuales seis corresponden a glicoproteínas mayores. Estas glicoproteínas juegan un rol fundamental en la infectividad y la virulencia y son los principales blancos del sistema inmune (Allen et al., 1986; Patel & Edington, 1983; Roizman & Baterson, 1985). El genoma de EHV-1 contiene 80 genes, de los cuales 72 corresponden a genes de copia única y 4 a genes duplicados. (Ibrahim et al., 2004).

En todo el genoma se encontraron un total de 20 sets de secuencias repetidas en tandem: ocho en U_L , dos en U_S y cinco en TR_S e IR_S (Telford et al., 1992).

Las regiones codificantes de EHV-1 contienen más de 99 codones. Los ORFs están organizados de manera compacta en ambas cadenas, sin solapamiento extensivo y con las regiones terminales cerca de los sitios candidatos a poliadenilación o están transcritos como miembros de familias 3' coterminales. Los ORFs 64, 65 y 66 están duplicados en TR_S e IR_S , y los ORFs 44 y 47 son homólogos con dos exones del gen U_L 15 de la especie *Human Simplex Herpesvirus 1* (Telford et al., 1992).

En todo el genoma se han localizado cinco regiones no codificantes de tamaño variable: a) la primera región mide aproximadamente 1kbp y está ubicada del lado derecho al final del genoma viral; b) la segunda región de un 1kbp se localiza entre el ORF 39 y el ORF 40; c) la tercera región posee aproximadamente 1.5 kbp localizada entre el ORF 62 y ORF 63; d) la cuarta región de 2kbp se localiza entre el ORF 63 y ORF 64 en la unión U_L/IR_S y e) la quinta región de 2.5 kbp se encuentra ubicada entre el ORF 64 y ORF 65.

La región intergénica (IR) ubicada entre el ORF 62 y el ORF 63 posee cuatro dominios, dos conservados y dos variables. Los dominios conservados se encuentran entre las posiciones 108803-108945 (dominio 1) y 109551- 110286 (dominio 3), mientras que los dominios variables se encuentran entre las posiciones 108946-109550 (dominio 2) y 110287- 110385 (dominio 4). El dominio variable ubicado entre las posiciones 108946-109550 posee inserciones y deleciones en las cepas japonesas, cuando se las comparan con la cepa británica Ab4. La inserción comprende una secuencia repetitiva de 18 bp. Las modificaciones en la IR ubicadas entre el ORF 62 y el ORF 63 tendrían un rol fundamental en la virulencia y en el crecimiento viral (Ibrahim et al., 2004) (Figura 5)



Epidemiología Molecular.

Las enzimas de restricción se han usado para la clasificación e identificación de los virus ADN permitiendo establecer la relación genética entre diferentes virus obtenidos a partir de una población relacionada

En el caso de los *Alphaherpesvirus*, numerosos estudios dan cuenta de las diferencias de perfiles electroforéticos entre diferentes cepas originadas por mutaciones puntuales de las bases púricas y pirimídicas que integran el ADN. El método de análisis con enzimas de restricción ayuda a resolver aspectos clínicos relacionados con las interacciones virus-hospedador, como la existencia de variantes más o menos virulentas en una población o la posibilidad de producir diferentes manifestaciones clínicas.

Los estudios epidemiológicos moleculares sobre EHV-1 en sus comienzos estuvieron basados en el análisis de los fragmentos de restricción del ADN (Allen, 1983). Con esta metodología se identificaron más de 16 electroferotipos y posteriormente se determinó la existencia de dos tipos genómicos: el EHV-1P y el EHV-1B (Allen et al., 1985). El EHV-1P difiere del EHV-1B en el número de sitios de reconocimiento de la enzima de restricción *Bam*HI en las regiones IR y TR; el EHV-1P tiene dos sitios de corte en cada región IR y TR, mientras que EHV-1B tiene solo un sitio *Bam*HI en cada una de esas regiones. El electroferotipo 1B fue reportado por primera vez en California en 1964. Este electroferotipo fue la principal causa de abortos en Kentucky central desde 1970 hasta 1974 y el aislamiento, a partir de fetos

abortados, de cepas correspondientes a este electroferotipo 1B comenzó a incrementarse en 1981 (Allen et al., 1983, Studdert et al., 1981).

Trabajos recientes de secuenciación genómica han permitido demostrar, mediante estudios moleculares del genoma viral, que las cepas que producen el síndrome neurológico presentan una mutación puntual en el sitio 2254 de la región genómica que codifica para la ADN polimerasa (ORF 30): las cepas neuropatogénicas poseen guanina (G₂₂₅₄) mientras que las no neuropatogénicas (“wild type”) poseen adenina (A₂₂₅₄) en la misma posición. (Nugent et al., 2006).

En Japón el primer aislamiento de EHV-1B fue realizado por Matsumura y colaboradores (2005), (datos no publicados) a partir de fetos abortados y se postula que este tipo viral podría derivar de USA, ya que el aislamiento fue realizado a partir de un caballo importado de Kentucky. Desde entonces ambos electroferotipos son encontrados en poblaciones de equinos en Japón y los aislamientos de EHV-1 realizados a partir de equinos con síndrome neurológico también han sido además caracterizados como 1P (Pagamjav et al., 2005).

En Argentina, se realizó el primer aislamiento viral a partir de un feto abortado en el año 1979 (Etcheverrigaray et al., 1982). En 1985 se aisló nuevamente el virus a partir de plasma rico en leucocitos provenientes de un animal con signos respiratorios (Galosi et al., 1989). A partir de entonces, se aislaron numerosas cepas virales. Sin embargo, aún no se han podido encontrar diferencias relacionadas con el potencial abortigénico de las mismas.

El análisis de 69 cepas aisladas desde el año 1979, demostró que solo dos de ellas corresponden al electroferotipo 1B. Los resultados obtenidos permiten inferir entonces que a partir del año 1996 existe heterogeneidad genómica entre aislamientos argentinos (Martínez et al., 2006).

Los últimos estudios de las cepas argentinas han demostrado además que el biotipo neuropatogénico (G₂₂₅₄) está presente en el país desde por lo menos el año 1996 y se asocia significativamente con la manifestación clínica de enfermedad neurológica (Vissani et al., 2008)

La infección por EHV-1 en el huésped natural y en el modelo experimental

La mayoría de las investigaciones relacionadas con EHV-1 se realizan utilizando como modelo experimental un mamífero placentario diferente del hospedador natural. El ratón (*Mus musculus*) BALB/C es el animal de laboratorio que se empleó con más frecuencia para los ensayos experimentales sobre esta virosis. De esta manera, se evita utilizar al hospedador natural de la infección, lo que desde el punto de vista económico es muy costoso (Awan et al., 1995). Este modelo permitió realizar estudios para evaluar la respuesta inmune ante la aplicación de determinados inmunógenos (Kukreja et al., 1998; Zhang et al., 2000), la capacidad inmunogénica de cepas poco patógenas (Galosi et al., 2006), la eficacia de drogas antivirales (Field et al., 1992) y la virulencia de diferentes cepas en diferentes períodos de gestación. (Awan et al., 1995; Bartels et al., 1998; Colle et al., 1996; Inazu et al., 1993; Iwai et al., 1998; Smith et al., 2001; Van Woensel et al., 1995; Walker et al., 1999).

El EHV-1 se encuentra distribuido en todo el mundo y afecta a los miembros de la familia *Equidae*. Las enfermedades causadas por este virus ocasionan importantes bajas en establecimientos de cría equina. La infección por EHV-1 produce una alta tasa de morbilidad en caballos y especies relacionadas. El virus se transmite a través de saliva o descargas nasales, fomites, alimentos y agua contaminada. El período de incubación varía y puede extenderse hasta 10 días posinfección (pi) (Dutta et al., 1980; Ostlund et al., 1991). El virus produce signos clínicos respiratorios, nerviosos, abortos y síndrome neonatal que lleva a la muerte del potrillo por lo general en las primeras 48 horas después del nacimiento (Smith, 1997).

En caballos infectados experimentalmente los primeros signos respiratorios aparecen a los 4-5 días pi. Se observa fundamentalmente rinofaringitis, la cual en primera instancia es serosa y más tarde mucopurulenta. Cuando la infección progresa aparece una traqueobronquitis, rinoneumonitis, linfadenomegalia, depresión e inapetencia. (Allen & Bryans, 1986; Mc Culloch et al., 1993). La resolución de los signos ocurre frecuentemente a los 12 días pi.

La infección intranasal de EHV-1 en ratones causa signos respiratorios al igual que en los equinos. Se observa polipnea y disnea, así como signos de afección sistémica, los ratones presentan deshidratación, postura encorvada y ocasionalmente conjuntivitis mucopurulenta, estos signos son evidentes dentro del primer día pi y se resuelven entre el día 5 y 10 pi. (Awan et al., 1990; Inazu et al., 1993; Walker et al., 1998; Walker et al., 1999).

El virus se aísla de equinos infectados tanto natural como experimentalmente a partir de epitelio nasal, faringe, tráquea, bronquios, bronquiolos, pulmón, cerebro, tiroides, útero, conjuntiva, semen y útero preñado. (Edington et al., 1986; Kydd et al., 1994; Smith et al., 1993; Tearle et al., 1996; Whitwell & Blunden, 1992).

En ratones infectados con EHV-1, se pudo aislar virus infeccioso a partir de tráquea, bulbos olfatorios, cerebro y ojos, raramente de hígado, mientras que no hubo aislamiento viral de linfonodos cervicales, adrenales, corazón, páncreas y riñón. (Awan et al., 1990; Baxi et al., 1996; Csellner et al., 1995; Inazu et al., 1993; Marshall & Field, 1997). Adicionalmente por *nested* PCRs se ha demostrado ADN viral en el ganglio esplénico y el GT (Baxi et al., 1996; Bartels et al., 1998).

El EHV-1 se disemina por sangre (viremia) interviniendo para ello las células blancas y es capaz de producir infecciones localizadas o generalizadas, atravesar la barrera placentaria y llegar al feto y producir abortos o enfermedad neonatal. La habilidad del EHV-1 de iniciar viremia asociada a células es el punto crítico para explicar al mecanismo patogénico relacionado al aborto, lo que queda claramente demostrado con aquellos EHV no virémicos y de bajo potencial abortigénico (Allen et al., 1998).

La infección con EHV-1 en yeguas preñadas puede resultar en un aborto. La mayoría de los abortos inducidos por EHV-1 ocurren durante los últimos meses de gestación. De acuerdo a Doll & Bryans (1963) esto puede deberse a la existencia de alguna resistencia al aborto si la infección ocurre durante los primeros meses de gestación. Esta aseveración está relacionada con el reducido número de lesiones vasculares y la expresión de antígenos virales en las células endoteliales de las hembras en los primeros meses de gestación en comparación con lo que ocurre cuando las hembras preñadas están cursando los últimos meses de gestación (Smith et al., 1996; Walker et al., 1999). Si el feto es infectado durante la preñez tardía, puede nacer muerto o vivir, pero en ese caso presentará depresión, polipnea y fiebre y morirá al cabo de horas o días (Smith et al., 1997).

Los efectos de la infección con EHV-1 en ratonas preñadas también dependen del estadio de gestación. La infección producida por EHV-1 en los primeros días de gestación está asociada con la reabsorción de fetos (Awan et al., 1995); en cambio cuando la infección se produce en la mitad o en la última etapa del periodo de gestación, los fetos pueden nacer prematuramente, así como nacer muertos o moribundos y luego morir en un tiempo breve. En el caso de ratonas preñadas infectadas con EHV-1, el

virus pudo ser aislado a partir de fetos, placenta y útero (Awan et al., 1991; Kukreja et al., 1998; Walker et al., 1998, Walker et al., 1999) aunque solo se pudo demostrar la presencia de virus en el epitelio coriónico, endotelio y trofoblastos placentarios mediante hibridización *in situ* (Awan et al., 1995).

Los signos neurológicos han sido descriptos en equinos adultos incluyendo ataxia y parálisis. Los signos neurológicos en ratones BALB/C también fueron demostrados (Gosztonyl et al., 2009). Estos son consecuencia de la infección directa de EHV-1 y de los cambios vasculares en el tejido nervioso central (Walker et al., 1999).

En la infección se encuentran comprometidos factores innatos y adquiridos de la respuesta inmune. La respuesta innata está mediada por polimorfonucleares neutrófilos, macrófagos, interferón y complemento que pueden limitar la unión del virus a las células. La respuesta adquirida puede estar mediada por linfocitos T o B e incluye a aquélla que previene la infección (humoral) y a la que actúa en la recuperación de la misma (celular y humoral). Los anticuerpos (Ac) humorales se encuentran dirigidos principalmente contra las glicoproteínas de la envoltura viral, sin embargo la respuesta inmune es de corta duración y los animales son susceptibles a la reinfección. (Smith et al., 1997). En cuanto a la respuesta inmune innata en el útero, otras células que no han sido estudiadas en la infección con EVH-1 pero que se sabe intervienen en otros procesos son los mastocitos y las *Natural Killers* (Challis et al., 2009).

El EHV-1 produce también infecciones latentes y ante determinadas situaciones de estrés, el virus latente se reactiva, y puede llegar a producir abortos, en muchas oportunidades sin signos premonitorios previos (Allen & Bryans, 1986; Crabb & Studdert, 1995).

Algunos autores sostienen que el aborto por EHV-1 es consecuencia de alguna falla en el sistema inmune del animal (Allen et al., 1998). Esto podría explicar los abortos aislados; sin embargo, en muchas oportunidades se suceden abortos epizoóticos (“tormentas de aborto”) que afectan a animales sujetos a planes de inmunización y con niveles adecuados de Ac. Este hecho permite suponer que existirían cepas con características genómicas que las harían más virulentas.

Las principales diferencias entre cepas que citan otros autores se basan en la sintomatología, en la replicación *in vivo* en leucocitos y células endoteliales y en la viremia. (Smith et al., 1992)

Recientemente, y tomando como criterio las diferencias en el potencial neuropatogénico de las cepas, se establecieron dos biotipos de EHV-1: el

neuropatogénico (G₂₂₅₄) y el no-neuropatogénico (A₂₂₅₄). La diferenciación entre ambos está asociada a la variación de un aminoácido del gen que codifica para la ADN polimerasa. Además otras de las diferencias encontradas entre estos dos biotipos se basan en la sintomatología que produce, en la replicación *in vivo* en leucocitos y células endoteliales, y en la viremia. Las cepas neuropatogénicas producen enfermedad severa, incluyendo una alta frecuencia de abortos y, en menor medida parálisis y prolongados niveles de viremia. Mientras que las cepas no neuropatogénicas producen signos respiratorios, cortos períodos de fiebre y generan daños no neurológicos. En la infección con estas cepas la viremia es escasa y la infección está restringida a las células endoteliales (Nugent et al., 2006; Smith et al., 1992).

La infección en equinos produce inflamación, necrosis y cuerpos de inclusión intranuclear en el epitelio nasal, faríngeo y ocasionalmente en el epitelio traqueal, así como en los centros germinales de los linfonodos mandibulares, faríngeos y bronquiales. Los estudios realizados demostraron bronquiolitis aguda, edema intersticial e infiltración neutrofílica de los bronquiolos terminales. Cuando la infección progresa, aparecen agregados perivasculares y peribronquiolares de células mononucleares, con cambios intersticiales pulmonares que se prolongan hasta el día 9 pi (Allen and Bryans, 1986; Edington et al., 1986; Kydd et al., 1994).

En el útero se ha encontrado vasculitis del endometrio, que se relaciona con el estado de preñez de las yeguas (Jackson et al., 1977; Walker et al., 1999). Tanto en la infección natural con EHV-1 como en la experimentalmente inducida, la infección está asociada con enfermedad neurológica. Se han encontrado trombos en los vasos sanguíneos de la sustancia gris y blanca del sistema nervioso central (SNC) y en las meninges, seguidas de vasculitis focal y necrosis del cerebro y la sustancia blanca de la médula espinal (Jackson et al., 1977; Edington et al., 1986; Whitwell & Blunden, 1992).

Las lesiones histopatológicas encontradas en los pulmones de los ratones infectados por EHV-1 son similares a las observadas en los equinos e incluyen: alveolitis focal y bronquiolitis, presencia de cuerpos de inclusión intranuclear en las células del epitelio bronquiolar, necrosis focal de neumocitos y agregados perivasculares y peribronquiolares de células inflamatorias, en el que inicialmente predominan neutrófilos, aunque a medida que la infección avanza las células mononucleares pasan a ser las más (Bartels et al., 1998; Csellner et al., 1995; Van Woensel et al., 1995; Walkers et al., 1999). Si bien en los primeros estudios no se evidenciaron procesos degenerativos o inflamatorios o lesiones vasculares en el SNC

(Bartels et al., 1998), un estudio mas profundo realizado recientemente demostró una respuesta inflamatoria no acompañada de endoteliotropismo (Gosztonul et al., 2009).

Como consecuencia de la infección experimental con EHV-1 en yeguas preñadas, el endometrio se observa con congestión y con severos y extensos cambios vasculares, que incluyen edema perivascular, áreas extensas de isquemia asociada con necrosis e infiltración perivascular de linfocitos, monocitos y neutrófilos (Smith et al., 1992; Carlton & Mc Gavin, 1995).

A diferencia de lo que ocurre en las yeguas, en las ratonas preñadas infectadas con EHV-1 no se han observado anormalidades histológicas en úteros. Sin embargo, en la placenta se observó congestión en el estrato medio del trofoblasto y una reducción del tejido trofoblástico normal desde el día 2 al 4 pi (Awan and Field, 1993; Awan et al., 1995; Walker et al., 1998) y necrosis del estrato medio del trofoblasto, presumiblemente como consecuencia de la congestión y consecuentemente isquemia, observada a los 3 días pi. En el caso de la placenta equina, se determinó la presencia de congestión y necrosis del corión y hemorragias petequiales en el estroma (Smith et al., 1992, 1993).

1.6. ESTUDIOS EVOLUTIVOS.

Sistemática Filogenética.

Los principios del Cladismo o Sistemática Filogenética fueron desarrollados por el entomólogo alemán Willi Hennig en el año 1950. Estos principios fueron presentados en su libro “Elementos de una Sistemática Filogenética” publicado en alemán en 1950 y en inglés en 1966. Esta metodología se utiliza para construir clasificaciones biológicas, que constituyen hipótesis sobre los patrones evolutivos de ancestralidad común, siendo útiles como sistema general de referencia en biología (Eldredge & Cracraft, 1980).

Los postulados básicos de la Sistemática Filogenética son los siguientes:

◆ Los taxones poseen un patrón jerárquico en la naturaleza que está dado por sus relaciones genealógicas.

◆ El patrón jerárquico puede representarse mediante diagramas jerárquicos ramificados (= cladogramas) que reflejan las relaciones de ancestralidad común (= cladísticas).

◆ El patrón de relaciones de parentesco expresado en un cladograma puede trasladarse a una clasificación filogenética.

◆ El cladograma se construye de tal manera que los cambios de un estado de carácter a otro sean mínimos.

◆ Los taxa de una clasificación filogenética deben ser grupos naturales o monofiléticos (= clados)

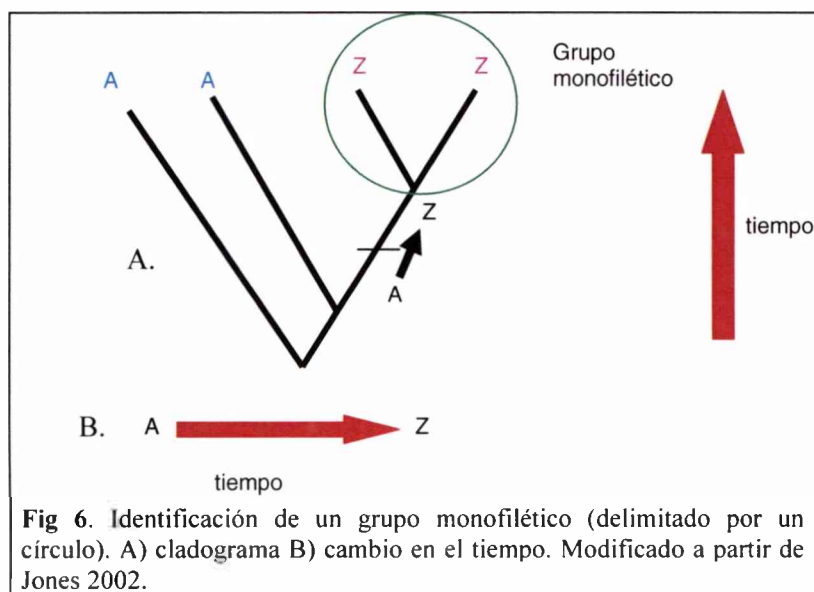
◆ Los grupos monofiléticos se reconocen por los caracteres derivados compartidos por sus integrantes (= sinapomorfias).

◆ La condición primitiva (= plesiomorfia) o derivada (= apomorfia) de un carácter depende de su distribución en los distintos niveles de la jerarquía taxonómica.

◆ La congruencia entre caracteres es el último test a aplicar, para distinguir entre similitud homóloga (debida al antecesor común) y similitud homoplásica (debida a paralelismo, convergencia o reversión).

Los atributos estudiados en los distintos grupos pueden presentar distintos valores y modos. Willi Hennig (1966) llamó a estos atributos **series de transformación**. El concepto de serie de transformación (= homología) se refiere a atributos que presentan distintos estados y que derivan de una estructura primigenia que estaba presente en el ancestro común del grupo en estudio.

El análisis de una serie de transformación nos permite ubicar de manera temporal a los distintos estados. Los estados que surgen primero en el tiempo se denominan plesiomorfias (= estados primitivos). Los estados que surgen como novedades evolutivas a partir de otro preexistente, como resultado de una transformación dentro del grupo, se denominan apomorfias. Las apomorfias son los estados que nos permiten identificar grupos monofiléticos, sobre la base de la posesión de apomorfias compartidas (= sinapomorfias) (Figura 6).



Datos moleculares.

Cuando se analizan moléculas, es preciso determinar su homología primaria. Los ácidos nucleicos y las proteínas presentan una secuencia lineal de unidades repetitivas (monómeros) que los caracterizan. Estas unidades repetitivas pueden ser tratadas como un carácter individual.

En las secuencias de ácidos nucleicos, cada carácter puede tener cuatro estados (A, T, C, G). Los caracteres de una secuencia se denominan habitualmente *posición*. Las posiciones se numeran a partir de 1, en sentido creciente, desde el extremo 5' hacia el extremo 3' de la secuencia.

Posición	1	2	3	4	5	6	n
Estado							X

Cuando se desea obtener una hipótesis filogenética de un grupo taxonómico a partir de un set de datos moleculares, es necesario determinar que posiciones de cada secuencia deben compararse entre sí. Para comparar las secuencias es necesario realizar un *alineamiento*. Este proceso consiste en establecer una homología de los sitios (caracteres) a fin de realizar comparaciones válidas entre sus distintos estados (nucleótidos en los ácidos nucleicos y aminoácidos en las proteínas) (Swofford et al., 1996).

En el proceso de alineamiento, o determinación de la *homología posicional*, cada nucleótido debe ser “rastreado” hasta reconocer el ancestro común del grupo en estudio. Puede ser que en este recorrido un nucleótido no haya cambiado (dato invariante), que hayan ocurrido sustituciones, o que se hayan agregado o perdido bases (*indels*) (Lanteri et al., 2006). El resultado es un *alineamiento* de secuencias, en el cual cada columna corresponde a una serie de transformación. Las columnas de alineamiento son denominadas posiciones del alineamiento.

Topologías.

Cuando poseemos un determinado *set* de datos, es posible plantear distintos escenarios evolutivos, que permitan explicar la distribución de estados de carácter observada (Swofford et al., 1996).

El criterio de optimalidad permite establecer de entre todas las topologías, aquellas que reflejan fielmente la historia evolutiva del grupo (Swofford et al., 1996).

Los métodos utilizados para la obtención de hipótesis filogenéticas son los siguientes: métodos de distancia, de parsimonia, de máxima verosimilitud y análisis bayesiano.

Los métodos de reconstrucción filogenética más aceptados son la máxima parsimonia, la máxima verosimilitud y el análisis bayesiano.

Los estudios filogenéticos realizados sobre Herpesvirus cuyo genoma ha sido completamente secuenciado, se basaron en la construcción de los árboles mediante la aplicación del algoritmo de *neighbor-joining*.

En las especies de la subfamilia *Alphaherpesvirinae* se realizaron estudios filogenéticos aplicando los algoritmos de *neighbor-joining*, *maximum likelihood* y máxima parsimonia.

La aplicación de estos tres algoritmos sobre un mismo set de datos ha sido realizado en cepas pertenecientes a la especie *Human Herpesvirus 3*. En este caso se han construido árboles no enraizados y el cálculo de valores de confianza se realizó aplicando el test de *Bootstrap* tras la realización de solo 100 réplicas (Mc Geoch et al., 1994).

El criterio de parsimonia también ha sido utilizado para reconstruir la historia evolutiva de cepas de *Herpes Simplex virus 1* (HSV-1) pero estos estudios consideraron un número restringido de cepas y un área geográfica muy limitada (Norberg et al., 2004).

Hasta el momento no se han realizado estudios filogenéticos en el mundo con cepas de EHV-1, solo Ibrahim y colaboradores (2004) realizaron un análisis de similitud entre cepas de EHV-1 utilizando el algoritmo de *neighbor-joining*, sin embargo este trabajo fue realizado con un escaso número de cepas de EHV-1.

En esta tesis se utilizaron el método de máxima parsimonia y máxima verosimilitud para la obtención de cladogramas como fue propuesto en el plan presentado oportunamente. Sin embargo, se utilizaron las metodologías basadas en distancias para la caracterización genética de las cepas argentinas.

Métodos de distancia.

La utilización de datos moleculares que expresan distancias genéticas, permitió que se propongán algoritmos que generen árboles evolutivos para reflejar las relaciones entre unidades taxonómicas operativas (OTUs) a partir de esas distancias genéticas. (Mayr & Ashlock, 1991; Forey et al 1992; Schuch, 2000).

Uno de los algoritmos propuestos es el *neighbor-joining* (Saitou & Nei, 1987)

Los árboles de distancia construidos mediante el algoritmo de *neighbor-joining* se expresan como *networks* (redes) o árboles sin raíz. La longitud entre los nodos y entre los nodos y los taxones terminales es proporcional a la divergencia genética entre ellos.

Para construir un árbol de distancia primero se seleccionan las unidades de estudio que poseen una distancia genética mínima y luego se van incorporando de manera secuencial las siguientes, tomando en cuenta las distancias mínimas. El árbol definitivo se obtiene luego de realizar una serie de rearrreglos con respecto a la topología inicial (Mayr & Ashlock, 1991).

El mejor rearrreglo será aquel que produzca el mejor ajuste entre la matriz de distancia derivada del árbol y de la matriz de distancia original.

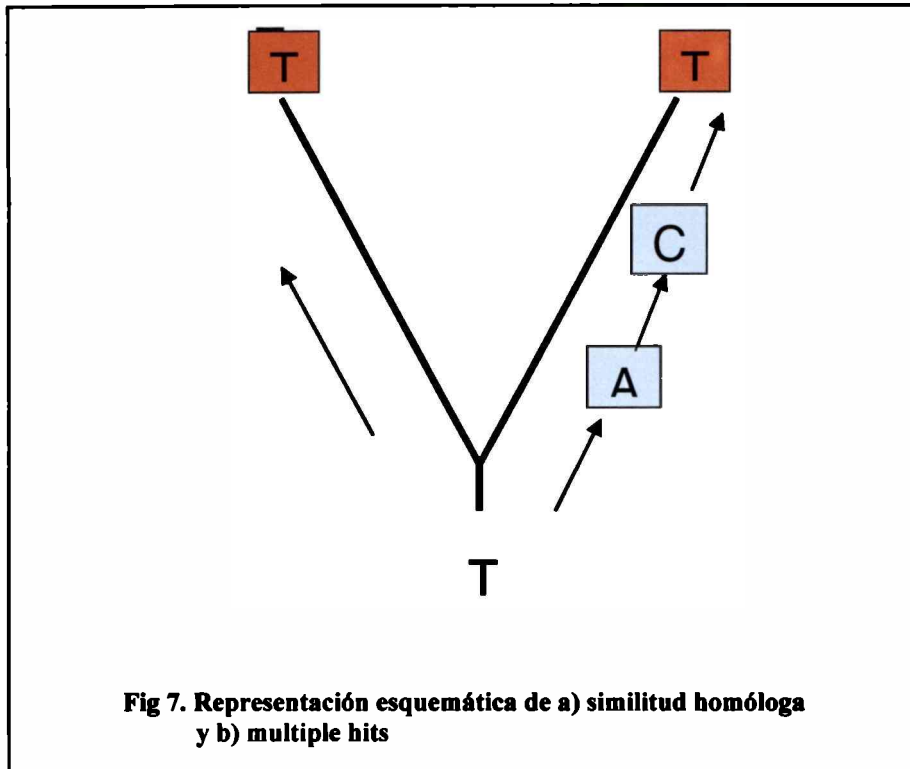
La matriz de distancia se construye a partir de las distancias genéticas calculadas entre pares de OTUs. En el caso de los datos moleculares, estas distancias deben ser corregidas, las cuales constituyen estimaciones de las distancias evolutivas, que reflejarían el número medio real de cambios por sitio nucleotídico que ha ocurrido entre un par de secuencias desde el ancestro común.

Cuando se realizan los reordenamientos se asignan largos a las ramas, en algunos casos estas pueden tener valores negativos, lo cual genera severas críticas a esta técnica. (Farris, 1981)

El análisis de set de datos de ADN plantea algunos problemas cuando las secuencias son muy divergentes, como por ejemplo, los cambios múltiples.

En los cambios múltiples (*multiple hits*), cuando más frecuente es un determinado tipo de sustitución de bases, mayor será la probabilidad de que hayan ocurrido cambios múltiples en un mismo (Arnedo, 1999).

Por ejemplo si dos unidades taxonómicas poseen "T" en un mismo sitio, se interpretará que dichos estados son homólogos, sin embargo puede haber ocurrido que uno de ellos hubiese cambiado numerosas veces a lo largo de la evolución, hasta volver al estado inicial. (Figura 7)



El número de sustituciones aumenta cuanto más divergente sean las unidades de estudio, pero en determinado momento, el número de cambios se hace constante, ya que estos ocurrirán en las posiciones que han cambiado. Si se realiza una curva de saturación, el número cambios aumentará hasta un determinado punto en que se convierte en asíntota (Figura 8).

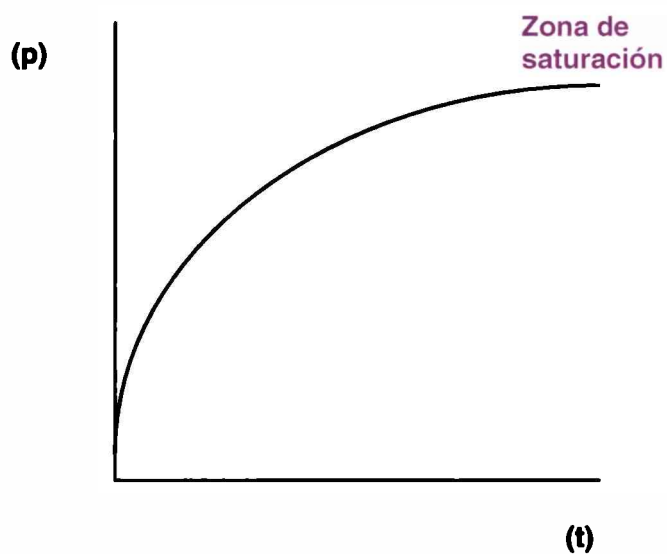


Fig. 8. Distancia genética entre dos taxa en función función del tiempo. p= distancia no corregida t= tiempo de divergencia.

Estos métodos pueden ser utilizados para inferir filogenias a partir de datos moleculares si se utilizan modelos evolutivos que permitan hacer correcciones de las distancias genéticas. La función para corregir las distancias entre las unidades taxonómicas debe corregir el valor teniendo en cuenta la homoplasia existente, calculada mediante la adopción de un modelo evolutivo (Jones, 2002).

En la actualidad existen 28 modelos evolutivos. A continuación se describen brevemente algunos de ellos:

Jukes- Cantor (Jukes-Cantor, 1969)

El modelo de Jukes-Cantor (1969) considera que existe una tasa de sustitución constante. Por ejemplo, considerando que existen dos secuencias de nucleótidos homólogas que divergen de un secuencia ancestral común t años atrás y que la tasa de sustitución nucleotídica es igual para todos los pares de nucleótidos por sitio por año (λ). El número esperado de sustituciones nucleotídicas por sitio entre dos secuencias (Som 2006) será:

$$\delta_{ij} = 2\lambda t$$

Cuando la proporción (p_{ij}) de los sitios nucleotídicos es conocida, el número esperado de sustituciones nucleotídicas (distancia evolutiva) puede ser estimada por:

$$\delta_{ij} = \frac{3}{4} \ln \left(\frac{1}{1 - \frac{4}{3} p_{ij}} \right)$$

En resumen, la corrección de Jukes-Cantor (JC; Jukes & Cantor 1969), supone igual frecuencia de bases y una misma tasa de cambio entre todos los pares de bases.

La asunción de tasas de sustitución constante por sitio (δ) a lo largo de la secuencia no es real para secuencias funcionales (Som et al., 2006). Kimura (1980, 1981), Takahata y Kimura (1981) y Gojobori y colaboradores (1982) demostraron que la tasa de sustitución varía en los distintos sitios de la secuencia, introduciendo un modelo de evolución en el cual la distribución de las tasas de sustitución por sitio se describe por una distribución gamma. Bajo este modelo el número esperado de sustituciones nucleotídicas entre dos secuencias está dado por:

$$\delta_{ij} = \frac{3\alpha}{4} \left[\left(\frac{1}{1 - \frac{4}{3} p_{ij}} \right)^{1/\alpha} - 1 \right]$$

La corrección de Felsenstein (F81; Felsenstein, 1981) establece que pueden existir distintas frecuencias de cada base:

$$B = 1 - (\pi_A^2 + \pi_T^2 + \pi_C^2 + \pi_G^2)$$

$$DF81_{(x,y)}: -B \ln [1 - p_{(x,y)} / B]$$

Donde π_i es la frecuencia de la base i .

La corrección Kimura dos parámetros (K2P; Kimura, 1980) estima la distancia a partir de las proporciones de transiciones (T_i) y transversiones (T_v). Este modelo asume un modelo evolutivo en el cual los cambios Purina ↔ Pirimidina (T_v) ocurren con diferentes frecuencias a los cambios Purina ↔ Purina y Pirimidina ↔ Pirimidina (T_i). La función es:

$$T_i = c + h + i + n.$$

$$DK2P_{(x,y)} = \frac{1}{2} \ln [1 / (1 - 2 T_i - T_v)] + \frac{1}{4} \ln [1 / (1 - 2 T_v)].$$

A medida que los modelos evolutivos incorporan la existencia de diferentes frecuencias para cada base y de diferentes tasas de cambio, se van convirtiendo en funciones matemáticas más complejas. La corrección de Hasegawa, Kishino y Yano (HKY; Hasegawa et al., 1985) es una corrección de la función K2P cuando existen diferentes frecuencias para cada base.

Existe un modelo generalizado (Rodríguez et al., 1990; Yang et al., 1994) que es aplicable a modelos evolutivos con diferentes frecuencias de bases y una tasa de sustitución particular para cada una de las sustituciones posibles (Jones, 2002).

Máxima Parsimonia.

El criterio de Simplicidad o parsimonia se utiliza para la elección de hipótesis que compiten entre sí para explicar los datos de la forma más simple y eficiente (Kitching et al., 1998). Las diferentes hipótesis que compiten entre sí deben ser sometidas a un test de falsación. Las hipótesis que no superen este test deberán ser reemplazadas por otras conjeturas (Popper, 1983, 1985). Las hipótesis más simples requieren menos supuestos ad hoc y su contenido informativo es mayor con respecto a las más complejas (Wiley, 1981) (Figura 9).

	1	2	3	4	5	6	7
A	1	0	0	1	1	1	1
B	1	1	1	1	1	0	0
C	1	1	1	0	1	0	0

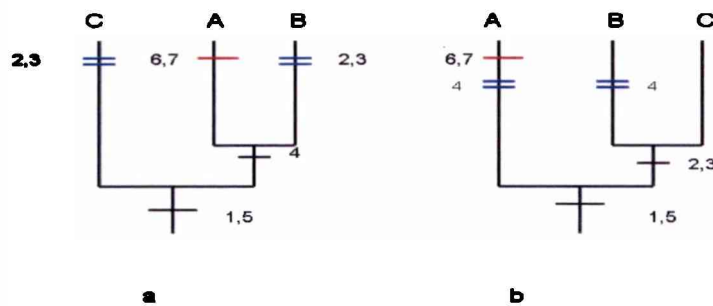


Fig. 9. Matriz de datos de tres taxones y siete caracteres. a-b topologías posibles. Sinapomorfías (-), Autapomorfías (-), Paralelismos (=).

El principio de *Simplicidad o Parsimonia* es aplicado por la Sistemática Filogenética para elegir la topología óptima entre varias hipótesis alternativas (Farris, 1982; Kluge, 1984). Por ejemplo, para la matriz de caracteres presentada de tres taxones existen dos hipótesis filogenéticas posibles. Cuando utilizamos los caracteres apomórficos para poner a prueba dicha hipótesis, se observa que la hipótesis “b” presenta menor número de homoplasias. En ella el carácter 4 es homoplásico para los taxones B y C, los caracteres 1 y 5 son sinapomorfías para los tres taxones, mientras que los caracteres 2 y 3 son sinapomorfías para los taxones B y C. Los caracteres 6 y 7 son autapomorfías para A. Las autapomorfías son caracteres apomórficos (novedades evolutivas) presentes en un solo taxón.

En la hipótesis “a” el número de caracteres que produce homoplasias es mayor que en “b”. Por este motivo se acepta la hipótesis “b”, al considerarse la más simple o parsimoniosa.

El criterio de simplicidad intenta encontrar entre todas las topologías posibles, las que minimizan la ecuación (Swofford et al., 1996)

$$L(t) = \sum_{k=1}^B \sum_{j=1}^N w_j \text{diff}(X_{k'j}, X_{k''j})$$

Donde B es número de ramas de la topología, N es el número de caracteres, K' y K'' son los nodos adyacentes a cada rama K, $X_{k'j}$ y $X_{k''j}$ representan a los estados asignados a los nodos internos y $\text{diff}(y, z)$ especifica el costo de transformación entre los estados y y z a lo largo de cualquier rama. w_j permite asignar distintos pesos a cada carácter: L (t) se llama habitualmente “largo del árbol” (Jones, 2002).

Criterios de optimalidad.

La optimización de caracteres para calcular el largo del árbol puede realizarse aplicando distintos criterios que permiten la asignación de distintos pesos a las transformaciones de estado entre caracteres. Los principales son: parsimonia de Wagner (Farris, 1970), parsimonia de Fitch (Fitch, 1971), parsimonia de Dollo (Farris, 1977), parsimonia de Camin y Sokal (Camin & Sokal, 1965), parsimonia de las transversiones (Swofford et al, 1996) y parsimonia generalizada (Sankof, 1975).

Parsimonia de Wagner. (Farris, 1970)

Este criterio se utiliza cuando se analizan caracteres binarios y multiestados ordenados. Las probabilidades de cambio en ambos sentidos son iguales, por cada transformación de un estado a otro se suma un paso.

Parsimonia de Fitch (Fitch, 1971)

Se aplica a caracteres binarios o multiestados desordenados, por ejemplo secuencias de ácidos nucleicos. Cada paso puede derivar en cualquier otro, contabilizándose un paso por cada transformación.

Optimización de Camin y Sokal (Camin y Sokal, 1965).

El criterio de Camin y Sokal propone las condiciones más estrictas con respecto a las probabilidades de cambios que pueden ocurrir durante la filogenia de un grupo taxonómico. Este criterio asume que los estados derivados no pueden revertir.

Optimización de Dollo (Farris, 1977)

Este criterio establece que los estados derivados aparecen solo una vez. Requiere que la polaridad de los caracteres haya sido preespecificada.

Fue introducido con la finalidad de ordenar escenarios evolutivos en los cuales cada estado apomórfico podría tener un origen común y todas las homoplasias deberían producirse por pérdidas secundarias (Kitching et al., 1998).

Este criterio se utiliza para datos de sitios de restricción.

Parsimonia de las Transversiones. (Swofford et al, 1996).

El modelo de parsimonia de las transversiones asigna distinto peso a las transversiones que a las transiciones.

Parsimonia generalizada. (Sankof, 1975).

Cuando se aplica el modelo de parsimonia generalizada, se asigna un costo a cada transformación entre estados. Los costos están representados como una matriz cuadrada, los elementos de esta representan el incremento en el largo del cladograma asociado con la transformación de un estado en otro (Kitching et al., 1998; Sankof, 1975).

De todos los modelos o criterios detallados anteriormente, el más adecuado para el análisis de secuencias de ADN es el de Fitch (Fitch, 1971), ya que se emplea para datos multiestados desordenados, de manera que los cambios entre caracteres tiene igual costo de transformación.

Pesado de caracteres.

El pesado de caracteres es una estrategia sumamente útil cuando existen caracteres incongruentes, permitiéndonos seleccionar o categorizar los caracteres de acuerdo a su comportamiento en el cladograma o sus características biológicas (Kitching et al., 1998).

La asignación a priori del análisis cladístico no resulta recomendable debido a que es un procedimiento arbitrario.

Existen diferentes implementaciones del pesado de caracteres:

Pesado a posteriori.

Esta estrategia hace referencia a la asignación de pesos a los caracteres de posteriormente a la construcción del cladograma. Esta idea fue sugerida por primera vez por Farris (1969) en relación al concepto de consistencia cladística.

Las incongruencias son una forma de describir niveles de homoplasia, las mismas se reflejan en el número de pasos extra requeridos para explicar un carácter (Kitching et al., 1998). Los procedimientos de pesado más utilizados son pesado sucesivo y pesos implicados.

En el pesado sucesivo una vez obtenidos los árboles mas parsimoniosos a partir de una matriz donde todos los caracteres tiene igual peso, se les asigna mayor peso a

aquellos caracteres que registren valores de índice de consistencia re-escalado más altos, y luego se calculan nuevamente los cladogramas. El procedimiento se repite hasta que se estabiliza el número de árboles obtenidos y sus índices de consistencia y retención no varían (Goloboff, 1998).

El procedimiento de pesos implicados: consiste en pesar caracteres utilizando una función cóncava (Farris, 1969) de la homoplasia. La asignación de pesos se realiza durante la búsqueda mediante la aplicación de la siguiente fórmula:

$$W = K / (K + ESi)$$

Donde W= peso.

ESi= número de pasos extra por carácter.

K= Constante de concavidad.

Pesado de caracteres a nivel molecular.

Cuando se trabajan con secuencias de ADN se suelen asignar pesos antes de realizar el análisis cladístico (Swofford et al., 1996). Se han propuesto varias alternativas entre las que podemos mencionar (Kitching et al., 1998):

- ◆ En diferentes posiciones de una misma secuencia.

Aplicar mayor peso a la 1° o 1° y 2° posición de los codones, que a la 3°.

Eliminar 3° posiciones.

- ◆ En las mismas posiciones.

Aplicar mayor peso a las transversiones que a las transiciones.

Aplicar diferentes pesos a cada uno de los cambios posibles entre bases, sobre la base de frecuencias observadas o esperadas.

La asignación de un menor peso o un peso nulo a las terceras posiciones codónicas, está sustentada que éstas tienen una tasa de sustitución mayor que la primera y segunda, debido a que en la mayoría de los casos son sustituciones sinónimas. A pesar de esto, algunos autores como Källersjö et al (1999) determinaron que la estructura de los cladogramas puede estar sustentada por terceras posiciones codónicas, por ende su eliminación produciría pérdida de información filogenética.

Máxima verosimilitud.

El análisis de máxima verosimilitud (*maximum likelihood*) se ha propuesto como una alternativa cuando se realizan análisis de secuencias de ADN.

Verosimilitud (*likelihood*) es un concepto estadístico general basado en la probabilidad de obtener los datos observados (De Queiroz & Poe, 2001).

La verosimilitud de una hipótesis H para un grupo de datos d y un modelo m, es proporcional a la probabilidad de obtener los datos d dada la hipótesis H (De Queiroz & Poe, 2001).

En un análisis filogenético, la hipótesis H es una topología determinada y d es la matriz de datos. La verosimilitud de un árbol es proporcional a la probabilidad de observar el mismo, dada una matriz y un modelo.

Para cada topología se evalúa la probabilidad neta de que el modelo evolutivo supuesto haya generado la distribución de estados observada.

Por lo tanto, verosimilitud (*likelihood*) es:

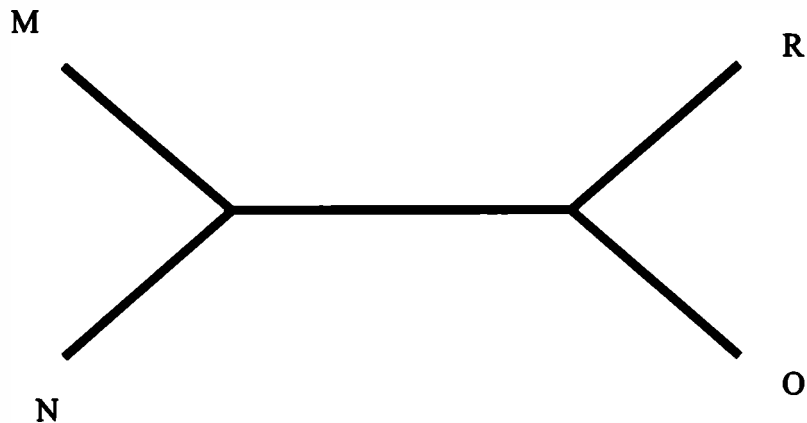
$$L = P(d; m; t)$$

L= likelihood, P = probabilidad, d= datos, t= topología y m= modelo.

Cuando se realiza el cálculo de verosimilitud se realiza una estimación del largo de ramas del árbol (Swofford et al, 1996). Esta estimación puede realizarse utilizando la corrección de Jukes-Cantor (1969).

Por ejemplo, teniendo en cuenta la siguiente matriz y topología. (Modificada de Jones, 2002).

	1	2	3	i	n
R	A	G	C		i ₁	n ₁
M	G	G	C		i ₂	n ₂
N	T	A	C		i ₃	n ₃
O	G	C	C		i ₄	n ₄



El likelihood (l) para una posición del alineamiento sería:

$$L(i) = \sum_{no=1}^{4 \exp(n-2)} P(t_{no})$$

no= es cada una de las $4^{(n-2)}$ combinaciones de estados que pueden ser asignados a los nodos para la topología t.

El cálculo de *likelihood* para el total de los datos se realiza mediante la siguiente ecuación:

$$L(t) = l_1 * l_2 * l_3 * \dots * l_i \dots * l_n$$

$$= \prod_{i=1}^n l_i$$

$$= \prod_{i=1}^n \sum_{no=1}^{4 \exp(n-2)} P(t_{no})$$

i= enésima posición del alineamiento

n= número de posiciones del alineamiento.

Modelos evolutivos.

Los modelos evolutivos se calculan a partir de los datos observados, realizando una evaluación de los diferentes modelos sobre una filogenia conocida o aproximada (Swofford et al, 1996; Posada, 1998; Posada & Crandall, 2001), estimando la

verosimilitud de la hipótesis filogenética bajo estos modelos y eligiendo aquel que posee un valor de *likelihood* significativamente más alto.

Cuando la hipótesis nula (el modelo más sencillo) es un caso especial de la hipótesis alternativa (el modelo evolutivo con más parámetros), la razón de verosimilitudes (LR= *likelihood ratio*) será:

$$LR = \max [L_0 | d] / \max [L_1 | d]$$

d= datos

L₀ = verosimilitud bajo la hipótesis nula.

L₁ = verosimilitud bajo la hipótesis alternativa.

La estimación de un modelo evolutivo puede lograrse calculando los cocientes de los valores de verosimilitud (LR) a partir de los modelos más sencillos hacia los modelos más complejos, hasta que la verosimilitud no aumente significativamente.

Búsqueda de los árboles de longitud mínima.

La búsqueda del árbol óptimo puede realizarse mediante la aplicación de distintos métodos, entre los que podemos mencionar las *búsquedas exactas*, *heurísticas*, y el algoritmo de *Wagner*. La elección del tipo de búsqueda a realizar se realiza en función del tamaño de la matriz de datos.

Las búsquedas exactas garantizan el hallazgo de los árboles de longitud mínima, pero solo cuando se analizan matrices de menos de 20-25 taxa. Dentro de los algoritmos exactos encontramos los *exhaustivos* y el de *branch and bound= bandb* (Hendy & Penny, 1982; Swofford & Olsen, 1990)

La búsqueda exhaustiva, se basa en la revisión de todos los cladogramas totalmente resueltos posibles y elegir el de menor longitud. Este algoritmo solo es aplicable para matrices de datos con menos de 11 taxones (Forey et al., 1992).

Las búsquedas heurísticas se utilizan cuando las matrices poseen más de 20-25 taxones, proporcionando soluciones aproximadas. Estas búsquedas no garantizan la el hallazgo de todos los árboles más cortos.

Estos métodos parten de un árbol inicial (o varios), sobre estos se realizan una serie de reordenamientos (*branch swapping* = permutación de ramas). El procedimiento de *branch swapping* consiste en mover las ramas de un árbol inicial a diferentes sectores del árbol, con el objeto de mejorar sus valores de optimalidad. Esto se realiza

hasta evaluar todas las combinaciones posibles, y se detiene cuando ya no hay árboles más cortos.

El método más utilizado para obtener el árbol inicial es el de *stepwise addition* (adición de los taxa de uno a uno) (Swofford, 1998). Consiste en unir 3 taxa, luego incorporar un cuarto en cada una de las posibles ubicaciones y dejarlo en el lugar que brinde el mayor valor de optimalidad, luego se agrega el quinto taxa en cada una de las ubicaciones posibles, seleccionado la que representa el mejor valor de optimalidad, esto se repite hasta haber incluido el último taxón.

Un árbol inicial no siempre es el óptimo, puede ocurrir que una topología óptima se convierta en subóptima al agregar el taxa n. Por ello se realizan los reordenamientos del árbol inicial.

Las formas más comunes de permutación de ramas son: *nearest neighbor interchange* (NNI), *subtree pruning and regrafting* (SPR), y *tree bisection reconnection* (TBR). En el método NNI los árboles se dividen en subárboles con una rama libre cada uno, que intercambian ramas con los vecinos. En SPR uno de los subárboles es cortado y reinsertado en una rama cualquiera.

El método TBR se basa en la conexión de ramas internas entre subárboles ya que no tienen ramas libres. La reconexión se realiza en todas las posiciones posibles.

Para una matriz de 40 taxones se realizan aproximadamente 5000 reacomodamientos SPR y 25000 TBR.

Una de las principales dificultades que presentan los métodos de *branch swapping* es la formación de las islas de árboles, estas son conjuntos de árboles igualmente parsimoniosos separados entre sí por un solo *swap*. Las permutaciones permiten encontrar las distintas topologías presentes en una isla, pero no las presentes en otras.

Cuando se analizan matrices muy grandes (500 taxones aproximadamente) se presentan inconvenientes para encontrar los árboles más cortos. Cuando esto sucede se han propuesto estrategias de búsqueda más eficientes (Schuch, 2000) y nuevas estrategias como *Parsimony ratchet* (Nixon, 1999) etc.

Medidas de soporte y confianza.

El soporte de un árbol constituye una medida de confianza del análisis filogenético, permitiendo inferir la influencia del azar en los resultados obtenidos (Kitching, 1998).

Los métodos descritos a continuación constituyen las principales medidas de soporte de clados individuales utilizados en un análisis filogenético.

Bootstrap. (Felsenstein, 1985)

Este procedimiento consiste en realizar un remuestreo con reposición de las columnas de la matriz de datos (posiciones de las secuencias de ADN) para obtener una matriz del mismo tamaño que la original (matriz remuestreada). Este proceso se realiza gran cantidad de veces (100-1000), de esta manera en cada pseudorreplia algunos caracteres pueden estar repetidos y otros faltar. Por cada matriz remuestreada se calcula un cladograma y el grado de conflicto se estima mediante un árbol de consenso de mayoría, que incluirá a todos los grupos soportados en más del 50% de las pseudorréplicas.

Jackknife. (Lanyon, 1985)

En este procedimiento las pseudorreplias se crean eliminando columnas (caracteres) o filas (taxones) Por este motivo las matrices remuestreadas serán de menor tamaño que la matriz original.

Las matrices remuestreadas tendrán el 50% o el 25 % de los caracteres de la matriz original.

Críticas a los principales métodos de reconstrucción filogenética.

La principal crítica realizada a los métodos de distancia y verosimilitud está centrada en que en ambos debe proponerse un modelo de evolución previo a estimar la filogenia. Desde una perspectiva cladística, esto es erróneo ya que los mecanismos de evolución deben analizarse luego de conocer la filogenia. El método de *maximum likelihood* también es criticado ya que los modelos más simples asumen que cada sitio tiene una misma tasa evolutiva, aunque en el proceso natural de evolución las tasas evolutivas suelen ser diferentes entre sitios y en las diferentes ramas del árbol, esto puede provocar inconsistencia en los resultados.

Con respecto al método de Parsimonia, el inconveniente que puede presentarse es el de atracción de ramas de ramas (*long branch attraction*, Felseinsten, 1978). En este caso, el

árbol presenta ramas en las que ocurrió mucho cambio evolutivo y ramas en las que el cambio fue escaso y el método de Parsimonia puede recuperar topología erróneas al interpretar paralelismos como sinapomorfias.

En general, los árboles obtenidos mediante los métodos de Máxima Parsimonia y Máxima Verosimilitud suelen ser similares, difieren solo cuando las tasas de sustitución son altas o presentan una variación muy alta entre las ramas del árbol. (Page & Holmes, 1998).

Historia evolutiva de los estados de caracteres.

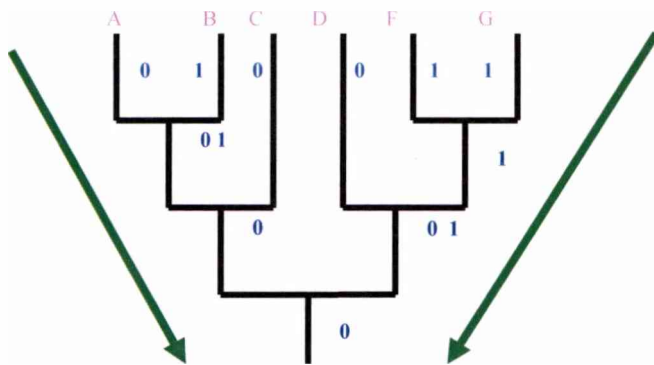
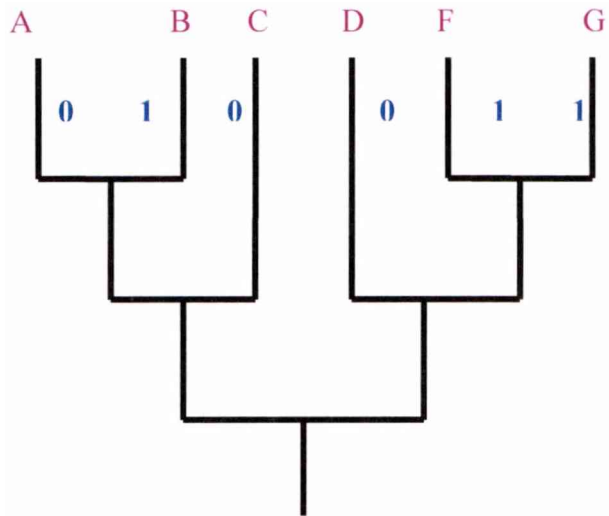
La distribución de los estados de caracteres observados en un cladograma que relaciona un grupo de taxones nos permite postular diferentes hipótesis acerca de los eventos históricos que condujeron a dicha distribución. La elección de una hipótesis puede realizarse aplicando algún criterio de optimalidad.

El proceso de reconstrucción de la historia evolutiva de los estados de caracteres se denomina "*mapeo de caracteres*" u *optimización*, pudiendo realizarse utilizando la "Máxima Parsimonia" como criterio de optimalidad. (Schuch, 2000; Page & Holmes, 1998; Kitching et al., 1998; Cigliano & Morrone, 2000).

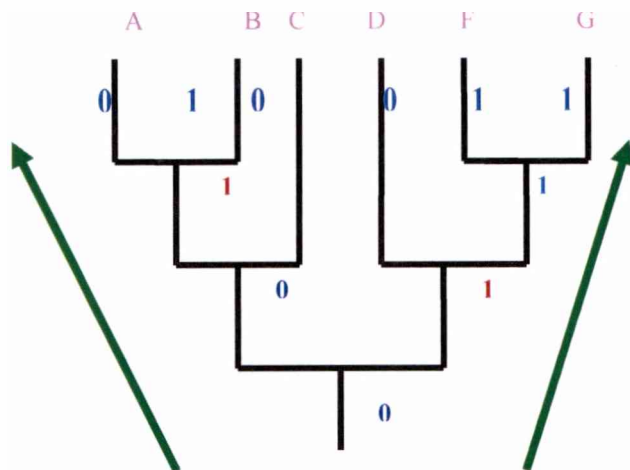
El proceso de optimización de un carácter consiste en asignar un estado definitivo a cada nodo interno del cladograma, de modo que el número de transformaciones entre los estados de caracteres sea mínimo (Schuch, 2000). Luego de optimizados los caracteres puede calcularse el número de pasos y la longitud del árbol.

Para optimizar un carácter es preciso realizar un procedimiento de lectura desde los taxones terminales del cladograma hacia la raíz, asignando a los nodos internos, los estados de carácter compartidos por los taxones hermanos. En el caso de encontrar ambigüedades, se resuelven realizando una pasada hacia arriba, asignándole a cada nodo interno el estado que represente un costo de transformación menor.

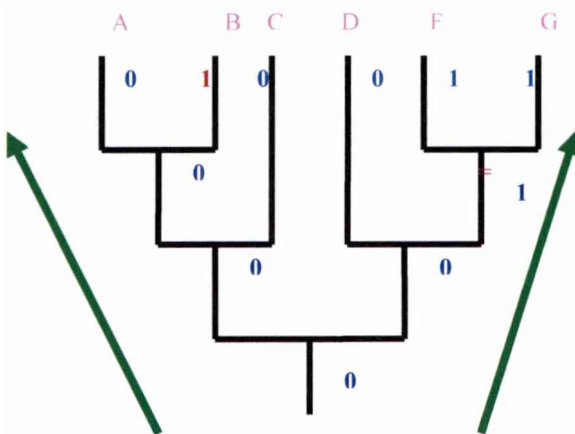
A continuación se ejemplifica el proceso de optimización del carácter (*vir*). El cladograma y la distribución de los caracteres se representan a continuación:



En este caso existen dos formas de explicar la distribución de los estados carácter (vir)



ACCTRAN



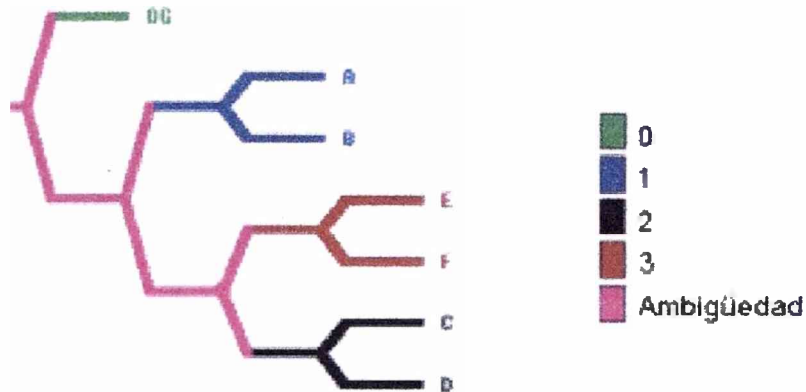
DELTRAN

En la optimización denominada *ACCTRAN* (*AC*celarated *TRAN*sformation) las transformaciones aparecen de manera temprana en la historia del grupo, por ello las homoplasias se explican como reversiones.

La optimización denominada *DELTRAN* (*DE*Layed *TRAN*sformation), explica a las homoplasias como convergencias (= paralelismos) debido a que los cambios aparecen en etapas tardías.

En el caso de que no haya homoplasias, la optimización *ACCTRAN* o *DELTRAN* brindan el mismo resultado. Sin embargo, puede ocurrir que alguna parte del árbol ambos tipos de optimización coincidan y en otros sitios no. En este caso, se dice que la reconstrucción es “ambigua” en algunos sectores.

A continuación se muestra una optimización de un carácter que presenta los estados 0, 1, 2, y 3 tal como se obtendría con el programa *Winclada*. Por *default* el programa indica solamente las optimizaciones no ambiguas y muestra las ramas del árbol en las que existe ambigüedad (indicado en color fucsia).



1.7. Hipótesis General.

- Existe una estrecha relación entre la patogenicidad, las características genómicas de las cepas y la historia evolutiva de las mismas.

1.8. Objetivos.

- Estudiar las propiedades genómicas de cepas de EHV-1 aisladas de abortos o de animales con sintomatología compatible.
- Estudiar la virulencia de diferentes cepas argentinas de EHV- 1 evaluando su endoteliotropismo y su capacidad abortigénica en el modelo ratón Balb/C.
- Comparar la distribución de las células del sistema inmune y de las células presentadoras de antígeno en el útero de las hembras Balb/C normales e infectadas.
- Establecer hipótesis sobre las relaciones filogenéticas que reflejen la evolución de las cepas argentinas de EHV-1.

Analizar la relación entre el grado de virulencia alcanzado por los distintos aislamientos detectados y la historia evolutiva del grupo.

2. Materiales y Métodos



2. MATERIALES Y MÉTODOS.

2.1. ESTUDIOS GENOMICOS DE CEPAS DE EHV-1

2.1.1. Cepas virales y multiplicación.

Las cepas virales argentinas utilizadas en el presente estudio fueron aisladas entre los años 1979 y 2004, la selección de las mismas se debió a los resultados obtenidos en sus patrones de restricción de ADN. Las cepas JA (Japón) y US (USA) fueron utilizadas como cepas de referencia.

El aislamiento de las cepas se realizó originalmente en células de línea RK13 (riñón de conejo) o en cultivos primarios de riñón de feto equino. Para este estudio se trabajó con pasajes variables entre dos y cinco de cada una de las cepas en células RK13 desarrolladas con Medio Mínimo Esencial (MEM) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) como medio de crecimiento (MEM-C) y con 2% de SFB como medio de mantenimiento (MEM-M). Cada una de las cepas fue titulada por el método de Reed y Muench, en microplacas y el título viral se expresó como $DICT_{50\%}/50 \mu l$ (Cunningham, 1971).

Tabla 1. Aislamientos de EHV-1 utilizados en el análisis.

Aislamiento	Origen	Biotipo	Fecha y lugar de aislamiento	AN
AR 1	Feto abortado	NNP	Galosi (1979). La Plata. Argentina	EU 366292
AR2	Rinoneumonitis	NNP	Galosi (1979). La Plata. Argentina	EU 366293
AR3	Feto abortado	NNP	Galosi (1990). 25 de Mayo. Argentina	EU 366294
AR 4	Feto abortado	NNP	Galosi (1990).Buenos Aires. Argentina	EU 366295
AR 6	Fetos abortados	NNP	Galosi (1990).Tucumán. Argentina	EU366296
AR 7	Feto abortado	NNP	Galosi (1990).Capitán Sarmiento. Argentina	EU 366297
AR 8	Feto abortado	NNP	Galosi (1996). Magdalena. Argentina	EU 366298
AR 9	Fetos abortados	NNP	Galosi (2000) La Pampa. Argentina	EU 366299
AR 10	Feto abortado	NNP	Galosi (2002). San Antonio de Areco. Argentina.	EU 366300
AR 11	Fetos abortados	NNP	Barrandeguy (2004). San Antonio de Areco. Argentina	EU 366301
AR 12	Fetos abortados	NNP	Galosi (2001). Trenque Lauquén. Argentina	EU 366302
AR 13	Fetos Abortados	NNP	Barrandeguy (1997). General Villegas. Argentina	EU 366303
AR 14	Enfermedad Neonatal	NNP	Barrandeguy (1998). Pilar. Argentina.	EU 366304
AR 15	Enfermedad Neonatal	NNP	Barrandeguy (1999). San Antonio de Areco. Argentina	EU 366305
AR 16	Fetos abortados	NNP	Galosi (1997). Entre Ríos. Argentina	EU 366306
AR 17	Enfermedad Neonatal	NNP	Galosi (1999). Cañuelas. Argentina.	EU 366307
AR 18	Fetos abortados	NNP	Barrandeguy (1999). General Pueyrredón. Argentina	EU 366308
AR 19	Fetos abortados	NNP	Barrandeguy (2000). General Pueyrredón. Argentina.	EU 366309
AR 20	Fetos abortados	NNP	Barrandeguy (1999). San Antonio de Areco. Argentina	EU 366310
AR 21	Fetos abortados	NNP	Galosi (2001). Córdoba. Argentina	EU 366311
AR 22	Fetos abortados	NNP	Galosi (1998). Trenque Lauquen. Argentina	EU 366312
JA	Fetos abortados	NNP	Kawakami (1970). Japón	EU 366313
US	Feto abortado	NNP	Doll (1954). USA	EU 366314
UK 1	Enfermedad neurológica	NP	Crowhurst(1981) Reino Unido	AY 665713
UK 2	Tormentas de abortos	NNP	Mumford(1987) Reino Unido.	AY 464052

NNP= no neuropatogénico.

NP= neuropatogénico.

AN= número de acceso al GenBank.

2.1.2. Extracción del ADN

Se utilizó el método de extracción de ADN total a partir de células RK13 infectadas con cada una de las cepas aisladas.

Las células fueron infectadas con una multiplicidad de infección = 1, se dejaron en adsorción durante 1 h a 37°C en atmósfera de CO₂ y se incubaron en las mismas condiciones con MEM-M. Aproximadamente entre las 18-24 h pi y cuando el ECP era ~ 80% las células fueron levantadas y lavadas dos veces con solución tamponada de fosfatos (CINa 0,13 M, ClK 0,002 M, Na₂HPO₄ 0,008 M, KH₂PO₄ 0,0014 M -PBS-). Posteriormente se digirieron con Proteinasa K (Promega, Cat V3021) en una concentración final de 0.2 mg/ml en buffer PK (100 mM de Tris-HCl pH 7.5, 12.5 mM de EDTA -ácido etilendiaminotetracético-) pH 8.0, 150 mM de NaCl y 1% de SDS (dodecil sulfato de sodio). A continuación se realizó una primera extracción con fenol saturado en buffer TE (10 mM Tris-HCl pH 8.0 and 1mM EDTA pH 8.0) y una segunda extracción con una mezcla de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1). Finalmente el ADN fue precipitado con dos volúmenes de etanol 99% frío, lavado con etanol 70% frío y posteriormente disuelto en agua destilada (AD) estéril. (Galosi et al., 1998a, 1998b).

2.1.3. Estudio con enzimas de restricción.

Los ADN totales extraídos fueron digeridos durante toda la noche a 37°C con enzimas de restricción (ER) según la concentración indicada por cada uno de los laboratorios proveedores. Se utilizaron las siguientes ER: *Bam*HI y *Bg*III (Promega, Cat R6021 y R6081).

Los diferentes fragmentos obtenidos (patrón de restricción -RP-) se separaron por electroforesis a 16V durante 16 h en gel de agarosa (Promega, Cat B-030-050) 0,5-0,6% en TAE *buffer* (40 mM de Tris-acetato pH 7.8, 5 mM de acetato de sodio y 1 mM de EDTA). Los geles se tiñeron con bromuro de etidio (concentración 10ug/ml) y se observaron y fotografiaron bajo luz UV. El ADN del bacteriofago lambda digerido con *Hind*III (Promega, Cat. G1711) fue utilizado como marcador de peso molecular.

2.1.4. Amplificación mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) del sector genómico en estudio

Se amplificó el sector genómico correspondiente a la región intergénica (IR) ubicada entre el ORF 62 y el ORF 63, comprendido entre las posiciones 108486-110681, de

acuerdo a la cepa de referencia AB4 denominada en este trabajo UK1 (Número de acceso al GenBank AY 665713)

Se utilizaron cuatro pares de cebadores:

SF1: 5' CCG GTC GTT CGG TTG AGC AAG TTT TTG ATG 3'

SR1: 5' CCT CCA GTC CAC AGA TAT GAC ATC CAA AGG 3'

SF2: 5' ACC GGA AGC TTG TCA TAT TTG TGA GCC TGG 3'

SR2: 5' TGT GAA CAT CAC CAC CAA TAC CAA GCA CGG 3'

SF3: 5' CC AAT TAG CCC CCA ATT GGC ACA TGG TAA 3'

SR3: 5' TTA CAA AAA CCT ATG CAG GGG TGT GGG TGG 3'

SF4: 5' TTC CCC CGG GCC TTA TAT CTT GCA GCT TTA 3'

SR4: 5' TTG TTT TAG TCG ACC GAA GCT CTG AGG GAG 3'

Dichos pares de cebadores generan productos de 655 bp (SF1-SR1), 692 bp (SF2-SR2), 605 bp (SF3-SR3) y 577 bp (SF4-SR4), ubicados entre las posiciones de 108486-108515 bp / 109141-109112 bp, 109042-109071 bp / 109734-109705 bp, 109660-109689 bp / 110265-110236 bp, 110104-110134 bp / 110681-110652 bp, respectivamente, de acuerdo a la cepa de referencia Ab4.

El análisis fue llevado a cabo sobre la porción de IR entre el ORF 62 y el ORF 63, ubicada entre las posiciones 108803-110385 bp.

La amplificación fue realizada utilizando un volumen final de 25µl integrados por: 2 µl de ADN molde, 1,5 µl de MgCl₂ (25 mM), 2,5 µl de *buffer* de PCR 10X, 1µl de *Taq* ADN

Polimerasa (Fermentas Cat. EP 0402), 2 µl de mezcla (0.2 mM de c/u) de dNTP (Promega Cat. C 114F), 1 µl de cada cebador (20 pM de cada uno) y 12 µl de AD.

Los ADN fueron amplificados en un termociclador Eppendorf (Mastercycler Gradient Eppendorf AG, Alemania) con el siguiente programa:

- a) desnaturalización inicial de 94°C durante 4 min,
- b) 30 ciclos de: 30 seg a 94 °, 20 seg a 60° y 60 seg a 72°
- c) extensión final de 4 min a 72°C.

Los productos obtenidos fueron analizados mediante electroforesis en geles de agarosa al 1,5 % con el objeto de confirmar la síntesis del ADN de interés. La tinción del gel se realizó mediante la inmersión de los mismos en la solución de bromuro de etidio (concentración 10 ug/ml). El tamaño de los fragmentos amplificados fue

comparado con un marcador de peso molecular (100 bp ladder, Promega Cat. G2101) observándolos en un transiluminador de luz UV.

Los productos de amplificación se mantuvieron refrigerados a -20° C hasta su purificación.

2.1.5. Purificación del ADN amplificado.

Los ADN amplificados fueron sembrados en geles de agarosa al 1,5% , sometidos a electroforesis a 100V durante 30 min, teñidos con bromuro de etidio y una vez localizados bajo luz UV cada uno de los fragmentos fue separado del gel de corrida mediante la escisión de la banda de interés. La purificación se realizó de acuerdo al protocolo indicado en el equipo “Wizard SV Gel and PCR Clean Up System, Promega/ Genomic DNA purification kit” (Promega lab. Cat A9281)

Los productos purificados fueron analizados y cuantificados mediante electroforesis en gel de agarosa comparativamente con el marcador de peso molecular (100 bp ladder, Promega Cat G2101).

2.1.6. Secuenciación de los fragmentos de ADN purificados.

Las cepas argentinas (denominadas AR), japonesas (JA) y norteamericanas (US) fueron preparadas y enviadas a secuenciar de acuerdo con las especificaciones del Biotechnology Resource Center (Universidad de Cornell), Ithaca, New York, USA. En todos los casos se secuenciaron ambas cadenas de ADN.

2. 2 ESTUDIOS DE VIRULENCIA.

2.2.1. Animales: se utilizaron ratonas BALB/C de 8 días de gestación. Los animales fueron tratados de acuerdo con las recomendaciones de la “Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio” (National Research Council, National Academy Press, Washington DC, USA 1996) y se alojaron en un bioterio para animales convencionales con temperatura, humedad y aire controlado y con disponibilidad de agua y comida *ad libitum*.

Para cada cepa en estudio se estableció el siguiente diseño de trabajo:

Grupo a): grupo de estudio de hembras preñadas inoculadas (n=6)

Grupo b): grupo control positivo de hembras sin preñar inoculadas (n=8)

Grupo c): grupo control negativo de hembras preñadas sin inocular (n=8)

2.2.2. Cepas virales: de acuerdo a los resultados obtenidos en los patrones de restricción y a la disponibilidad de animales de experimentación se estudiaron las cepas denominadas AR2, AR3, AR8 con un título viral de ($10^{6.5}$ DICT_{50%} /50 ul)

2.2.3. Inoculación experimental y seguimiento clínico: cada una de las cepas utilizadas en estudio fue inoculada por vía intranasal, bajo anestesia suave de acuerdo al diseño previsto (Grupo a y b) a los 8 días de preñez de las hembras. Los animales controles negativos (Grupo c) fueron inoculados de idéntica forma con lisado de células RK 13 en MEM-M.

Los animales fueron examinados diariamente para constatar: a) aparición de signos clínicos característicos, b) modificación de peso diario y c) la producción de abortos o interrupción de la gestación. Los datos se registraron en planillas confeccionadas para tal fin.

2.2.4. Toma de muestras para aislamiento viral (AV), estudios histológicos (H) y detección de ADN viral por PCR:

Grupo a): Grupo de estudio: los animales se sacrificaron a los 10 días de preñez para determinar la existencia de reabsorciones fetales, la presencia de anomalías en los fetos, la supervivencia de los mismos, la presencia de ADN viral por la técnica de PCR y realizar el AV. Se extrajeron muestras de las placentas y los embriones completos, para la realización de técnicas histológicas y de lectin e inmunohistoquímica. Además se recolectaron muestras de pulmón para corroborar la presencia de lesiones y la determinación de Ag virales.

Grupo b): Grupo control positivo de infección: se sacrificaron dos animales a las 24 hs, 2, 4 y 7 días pi. Antes del sacrificio se extrajo sangre con heparina para detectar ADN viral. Se tomaron muestras de pulmón, hígado y bazo para AV, para detección de ADN y para estudios histológicos.

Grupo c): Grupo control negativo preñado: seis animales se sacrificaron antes del parto (10 días) y se tomaron muestras similares a la de los animales infectados. Otros dos animales se dejaron para que lleguen al parto normalmente.

2.2.5. Determinación de viremia: La sangre heparinizada de los animales pertenecientes al Grupo b (control positivo de infección) fue centrifugada a 1000xg durante 15 min. El paquete celular obtenido se mezcló con 1 ml de solución tamponada de lisis de glóbulos rojos (0,85% NH₄Cl, 0.017M tris; pH 7.4) durante 5 minutos y posteriormente se centrifugó bajo las mismas condiciones descriptas anteriormente. El sobrenadante fue eliminado y el paquete celular resuspendido en el sobrenadante original recogido en la primera centrifugación. Este plasma rico en leucocitos se utilizó para aislamiento viral empleando como medio de cultivo MEM-M con metilcelulosa.

2.2.6. Detección de ADN viral por PCR: Las muestras de sangre entera y de tejidos fueron procesadas para extracción de ácido nucleico viral utilizando los protocolos de un equipo comercial (Wizard Genomic DNA Purification Kit, Promega Cat A1120). Se realizó la técnica de PCR mediante la metodología descrita por Galosi y col. (2001) usando un par de cebadores específicos derivados del gen que codifica para la gpC:

- P1 5'-ACACCAACTCACACAACTCCGAATC-3' y
- P2 5'-GCATACAAGGACCACACGTAAATG-3'

La amplificación se realizó sobre un volumen de reacción de 25 ul formado por: 2,5 µl de ADN, 1,5 µl de MgCl₂ (25 mM), 2,5 µl de *buffer* 10X, 1 ul de Taq polimerasa, 1 µl de mezcla de dNTPs, 1 ul de cada cebador (20 pM) y 14,5 ul de AD.

Las condiciones de la reacción de amplificación fueron:

- a) desnaturalización inicial a 94°C por 5 min
- b) 35 ciclos de: 94°C 1 min, 55°C 1 min, 72°C 90 s
- c) extensión final a 72°C por 5 min.

Los productos obtenidos fueron corridos en un gel de agarosa al 2% en TBE *buffer* (50 mM Tris pH 8.0, 50 mM de ácido bórico y 1 mM de EDTA). Los geles fueron teñidos y visualizados de acuerdo a metodología previamente descrita. Una banda de 489 bp fue considerada un resultado positivo

2.2.7 Aislamiento viral (AV): se aplicó la técnica convencional de procesamiento de las muestras para estudios virológicos: el tejido fue lavado en MEM, cortado en pequeños trozos con tijera, dispersado en mortero con arena estéril, diluido 10%P/V con MEM-M y centrifugado a 2000xg durante 10 min y a 6000xg durante 10 min. El sobrenadante fue utilizado como inóculo. El AV se realizó sobre células RK13 las que

fueron observadas durante 7 días para corroborar la aparición de ECP. Se realizaron tres pasajes ciegos antes de dar por negativa a la muestra.

2.2.8 Estudios histológicos (H):

Hematoxilina–eosina (HE)

Esta técnica resulta de elección para comenzar estudios descriptivos generales, ya que permite reconocer claramente distintas estructuras tisulares y proporciona imágenes citológicas bien definidas, especialmente detalles nucleares.

Para la presente tesis se utilizó la técnica de hematoxilina de Hill y eosina amarilla en solución acuosa. Los cortes luego de ser desparafinados e hidratados fueron sumergidos en la solución de hematoxilina de Hill durante 3 a 5 minutos. Posteriormente se sumergieron en agua corriente para producir el virado del colorante. Luego, los cortes fueron colocados en la solución de eosina, donde permanecieron durante 1 minuto. Por último se realizaron la deshidratación, el aclarado y el montaje (Martoja & Martoja, 1970; Bancroft et al., 1990)

Ácido peryódico-Schiff (PAS) – hematoxilina.

Esta es una técnica histoquímica de PAS es simple, rápida y muy utilizada para la detección de carbohidratos en los tejidos. La reacción se basa en la producción de grupos aldehídos libres a través de la oxidación de los grupos 1:2 glicol o de sus derivados aminados o alquilaminados, por medio del HIO_4 . Los aldehídos libres reaccionan con el H_2SO_4 -fucsina del reactivo de Schiff para formar un compuesto que adquiere color magenta. En el presente trabajo esta técnica se utilizó para determinar la presencia de las células *Natural Killers* uterinas o células granulares glandulares metriales (GMG) que poseen gránulos positivos a esta reacción.

Para el empleo de esta técnica se utilizó una solución de HIO_4 al 1% y el reactivo de Schiff. Los cortes fueron desparafinados e hidratados como fuera descripto previamente, y se trataron con el HIO_4 al 1% durante 15 minutos. Se lavó con agua destilada y posteriormente se colocó el reactivo de Schiff, controlando el color rosado durante 5 a 10 minutos. Cuando alcanzaron el color deseado se lavó con agua corriente durante 10 minutos y luego con agua destilada. Los cortes fueron deshidratados, aclarados y montados. Por último, se utilizó hematoxilina como contraste nuclear. Las sustancias PAS positivas se observaron de color rosa fucsia. Los núcleos y otras estructuras basófilas se observaron de color azul violáceo (Martoja & Martoja, 1970; Bancroft & Stevens, 1990)

Técnica de Giemsa

Se procedió inicialmente como para la técnica de hematoxilina y eosina, pero los cortes fueron sumergidos durante 45 minutos en una solución comercial de Giemsa (Martoja & Martoja, 1970; Bancroft & Stevens, 1990) para posteriormente proceder a la deshidratación y el montaje

Lectinhistoquímica (LHQ)

Las lectinas son un grupo heterogéneo de proteínas en no inmunes, que se unen con alta especificidad y en forma reversible, no covalente, a ciertos residuos de azúcares monosacáridos presentes en los glicoconjugados. El fundamento de la elección de estas técnicas reside en su capacidad para poder localizar, identificar y diferenciar con gran sensibilidad y especificidad variaciones en la secuencia de carbohidratos de las células, lo que permite discriminar distintas poblaciones celulares. T. En el presente trabajo se utilizó esta técnica para corroborar el reconocimiento de las GMG cuyos gránulos se marcan intensamente cuando se realiza lectinhistoquímica con la lectina DBA (Koga et al., 2009)

Los cortes de 3 μm se montaron en portaobjetos tratados con γ -metacriloxypiriltrimetoxi-silane (M 6514, Sigma) para evitar el desprendimiento del material durante alguno de los pasos de la técnica. Luego, se desparafinaron con xilol y se sumergieron en alcohol absoluto. Posteriormente, se los incubó en agua oxigenada (H_2O_2) de 100 volúmenes al 0,03% en metanol, durante 30 minutos a temperatura ambiente, para inhibir la actividad de la peroxidasa endógena. Se realizó la hidratación de los cortes mediante soluciones de etanol a concentraciones decrecientes (96° a 70°) y, finalmente se los lavó 3 veces con PBS, pH 7,6. Los cortes se incubaron en una cámara húmeda con albúmina sérica bovina (BSA) al 1% en PBS durante 30 minutos, para bloquear las posibles uniones inespecíficas. Luego de lavar con PBS, los cortes se incubaron con la lectina DBA (*Dolichos biflorus*, con afinidad para α -D-GalNAc), biotinilada. Se utilizó el sistema Streptavidina-peroxidasa (Horseradish peroxidase Streptavidine-RTU-Vector laboratorios, INC, Burlingame, CA, 94019, Lot.Nº U0331) como detector y amplificador de las uniones producidas, este sistema se basa en la afinidad existente entre la Streptavidina y la biotina. La enzima peroxidasa actúa sobre el agua oxigenada que se agrega junto con el sistema revelador. El producto de esta reacción reacciona con un dador de electrones (cromógeno) que genera un producto coloreado e insoluble al agua. En la presente tesis el cromógeno utilizado fue la

3',3'diaminobencidina (DAB), que genera un color pardo en los sitios de unión de las lectinas con los carbohidratos de los tejidos. Finalmente, se realizó una coloración de contraste con hematoxilina para la marcación de los núcleos. Las regiones marcadas positivamente se evidencian con una coloración pardo dorada oscura, producto de la oxidación de la diaminobencidina. Los núcleos se observan de color azul violáceo, producto de la coloración con hematoxilina. (Cobo et al., 2004).

Inmunohistoquímica

Los cortes seleccionados se montaron en portaobjetos tratados con γ -metacrioxipropyltrimetoxi-silane (M 6514, Sigma) o sobre vidrios positivados (Star frost, Knittel glaser) para evitar el desprendimiento del material durante alguno de los pasos de la técnica. Luego se realizaron la desparafinización, la hidratación y el bloqueo de las peroxidasas endógenas de forma similar a lo descrito anteriormente para las técnicas de LHQ. Sin embargo, se aplicó a las muestras un método de recuperación antigénica, para conseguir el “desenmascaramiento” de las ligaduras existentes en las cadenas proteicas del tejido originadas por la acción del formaldehído como fijador. Estas interacciones interfieren con la penetración y posterior unión de los anticuerpos.

La recuperación antigénica se realizó en un horno de microondas a temperaturas superiores a 100°C durante 5 minutos, colocando los cortes en *couplings* con una solución tamponada de citrato (pH 6) durante 5 minutos. Los cortes se dejaron a temperatura ambiente y luego de lavarlos con PBS se procedió a bloquear las uniones inespecíficas mediante la incubación con BSA al 1%. La incubación con los anticuerpos primarios elegidos se realizó durante 24 horas a 4°C.

El sistema de detección y amplificación utilizado fue EnVision® Dako (EnVision +dual link system peroxidase; Ref.K4061) o el método de la streptavidina-biotina marcada (LSAB) (Dakocytomation-LSAB2® System-HRP; Ref. K0675, goat anti-rabbit and goat anti-mouse immunoglobulins). El sistema envision consta de un polímero de dextrano marcado con la enzima peroxidasa y conjugado con inmunoglobulinas y, por lo tanto, con capacidad de unirse al anticuerpo primario. En el sistema LSAB luego de la incubación del tejido con el anticuerpo primario se realiza una incubación con un anticuerpo secundario biotilado y por último se aplica la solución de streptavidina marcada con peroxidasa. En esta técnica también se emplea a la 3',3'diaminobencidina (DAB) como cromógeno. La coloración de contraste se realizó con hematoxilina, de mismo modo que con la LHQ. Como anticuerpos primarios se

utilizaron un anticuerpo policlonal anti EHV-1, preparado en conejos en nuestro laboratorio para la detección de antígenos (Ag) virales (Galosi et al., 2004) y un anticuerpo comercial anti c-Kit (CD117) para detectar mastocitos.

2.2.9. Recuento celulares.

Como ya se menciona los mastocitos se reconocieron mediante las técnicas de Giemsa e Inmohistoquímica anti C-kit. Mediante ambas técnicas se obtuvo un número de células por campo semejante (diferencia menor al 5%), por lo que se seleccionó la técnica de Giemsa para realizar el recuento definitivo. Para cada animal se determinó el promedio de mastocitos por campo tras la observación de 20 campos de mesometrio, 20 campos de miometrio y 20 de estroma endometrial a 400X. Se obtuvo un promedio general de todos los sectores y un promedio para el mesometrio en cada animal. Los resultados fueron analizados mediante ANOVA.

Las GMG o células NK uterinas se reconocieron mediante la técnica histoquímica de PAS y la lectinhistoquímica con el uso de la lectina DBA. Las mejores imágenes se obtuvieron con DBA por lo que la marcación con esta lectina fue la técnica seleccionada para el recuento definitivo. Para cada animal se determinó el promedio de GMG por campo tras la observación de 20 campos de decidua a 400X. Los resultados fueron analizados mediante ANOVA.

2.3. ANÁLISIS DE LAS SECUENCIAS AMPLIFICADAS.

Se analizaron las secuencias correspondientes a las 25 cepas virales de diferentes regiones geográficas. Veintiuna de las cepas fueron aisladas en diferentes puntos de Argentina. Las cepas JA y US fueron aisladas en Japón y USA, respectivamente. Las secuencias correspondientes a las cepas Ab4 y V592 fueron obtenidas del GenBank, (www.ncbi.nih.nlm.gov/Entrez). Ab4 y V592 fueron denominadas UK 1 y UK 2, ambas fueron aisladas en el Reino Unido.

Se utilizó como “*outgroup*” la secuencia correspondiente a la cepa NS80567, perteneciente a la especie *Equid Herpesvirus 4*. (nº de acceso al Genbank: NC 001844). La elección de la misma se basó en búsquedas bibliográficas y en la realización de un BLAST (búsqueda local) disponible en (www.ncbi.nih.gov/BLAST).

La edición de las secuencias se realizó manualmente mediante la utilización de procesadores de texto y mediante la utilización del programa Bio-Edit (Hall, 1999). La interconversión de formatos se realizó mediante la utilización de los programas Bio-Edit (Hall, 1999), Proseq 3.0 (Filatov, 2002) y Genedoc (Nicholas et al., 1997)

La diversidad nucleotídica y el porcentaje de identidad entre cepas de EHV-1 fue calculada mediante la utilización del programa Swaap versión 1.0.3 (Pride, 2000).

El alineamiento de secuencias se realizó mediante la utilización del programa Clustal X (Thompson et al., 1997), aplicando los siguientes parámetros: eliminación de gaps antes del alineamiento (*reset all gaps before alignmnet*), GOP (*gap opening penalty*)= 15 y GEP (*gap extension penalty*)= 6.66, estos dos últimos parámetros establecen la penalidad por abrir un gap y por extender el mismo, respectivamente.

El análisis de similitudes globales se realizó a través de la construcción de matrices de distancia, el dendrograma se construyó mediante la aplicación del algoritmo de *neighbor-joining*. (Saitou & Nei, 1987).

El análisis filogenético se realizó mediante la utilización del programa PAUP* (Phylogenetic *Analysis Using Parsimony*; Swofford, 1998) 4.0 beta version, para los cálculos de máxima verosimilitud. El programa TNT (Tree *Analysis using New Technology*; Goloboff et al., 2003), fue utilizado para los cálculos por máxima parsimonia mediante la realización de búsquedas heurísticas con 1000 RAS (*random addition sequences*) + TBR (*tree bisection and reconnection*)

La estimación del soporte de los grupos se realizó mediante las técnicas de *bootstrap* (Felsenstein, 1985) incluidas en PAUP* y TNT (Goloboff et al., 2003) y de *jackknifing*. Por cada pseudo-muestra se realizaron 1000 RAS +TBR.

3. Resultados



3. RESULTADOS

3.1. ESTUDIO GENOMICOS DE CEPAS DE EHV-1

3.1.1 Multiplicación de las cepas virales y estudio con enzimas de restricción

Todas las cepas virales en estudio produjeron 100% de ECP entre las 36 y 48 hs pi. El título viral determinado por el método de Reed y Muench varió para las diferentes cepas entre $10^{5.3}$ y $10^{6.5}$ DICT_{50%}/50 μ l

El estudio con ER demostró que:

- a) la mayoría de las cepas presentaban pequeñas variaciones de movilidad en el fragmento *Bam*HI “e” y *Bg*II “m” correspondiente a la IR, en algunas estos cambios eran mas perceptibles que en otras,
- b) el fragmento *Bam*HI “g” no presentó variaciones de movilidad en ninguna de las cepas analizadas,
- c) en el resto de los fragmentos de ADN no se observaron cambios de movilidad perceptibles por esta metodología,
- d) con la cepa AR1 se confirmaron los resultados obtenidos en trabajos previos,
- e) las cepas AR2, AR3 y AR8 presentaron mayor diferencia de movilidad del fragmento *Bam*HI”e” y/o *Bg*II”m”,

A modo de ejemplo se muestran las imágenes de algunas de las cepas en estudio (Figuras 10 a y 10 b).

3. 2 ESTUDIOS DE VIRULENCIA

3.2.1 Inoculación experimental y seguimiento clínico

Todos los animales de los Grupos a y b, infectados experimentalmente con cada una de las cepas en estudio presentaron signos clínicos a las 24 hs pi. Los mismos consistieron en disnea, pelo hirsuto y depresión generalizada. (Figura 11) Estos signos se hicieron más intensos a las 48 hs para luego ir disminuyendo hasta desaparecer al 5to día pi (dato que solo se observó en aquellos animales de los Grupos b: controles positivos de infección)

El peso corporal disminuyó entre el 1er y el 2do día pi en todos los animales infectados y gradualmente fueron recuperándose, hasta igualar los parámetros normales de los controles, observación realizada en los animales de los Grupos b. En el caso de

los animales inoculados con la cepa AR1, la cual había sido analizada en estudios previos a este trabajo, se observó que los animales presentaron un incremento constante del peso corporal, datos que se usaron como controles (Figura 12). Los animales del Grupo c (controles negativos preñados) no presentaron signos clínicos ni pérdida de peso corporal. Los dos animales que no se sacrificaron llegaron al parto normalmente. Ninguno de los animales inoculados murió o presentó signos nerviosos antes del sacrificio programado.

La cepa AR2 produjo pérdida de la preñez en todos los casos. En la necropsia de los animales inoculados con las cepas AR3 y AR8 se observaron algunas reabsorciones y fetos normales.

3.2.2 Determinación de viremia. Aislamiento viral. Detección de ADN por PCR:

Grupo a (Grupo de estudio): se aisló virus a partir del pulmón de todos los animales inoculados con las tres cepas. Los úteros de los seis animales inoculados con la cepa AR2, dos inoculados con la cepa AR3 y uno de los inoculados con la cepa AR8 fueron positivos para AV. No se aisló virus de los fetos de las hembras inoculadas con las cepas AR3 y AR8. La detección de ADN fue positiva para las muestras de pulmón y útero positivas al AV. No se detectó ADN a partir de las muestras de sangre y de los fetos de las hembras inoculadas con AR3 y AR8.

Grupo b (Grupo control positivo de infección): las muestras de pulmón tomadas de los animales inoculados con las tres cepas y sacrificados a las 24 h, 2 y 4 días pi resultaron positivas para AV. Las muestras de pulmón tomadas a los 7 días pi resultaron en todos los casos negativas. No se detectó ECP en cultivos celulares inoculados con las muestras de sangre ni se aisló virus de los órganos restantes. La detección de ADN fue positiva para las muestras de pulmón tomadas a las 24 h, 2 y 4 días pi.

Grupo c (Grupo control negativo de infección): el AV y la detección de ADN resultaron negativo para todas las muestras.

3.2.3. Estudios histológicos

Pulmón

En el pulmón en todos los animales inoculados con las diferentes cepas se observaron evidencias histológicas de infección en los cortes teñidos con HE. Se observó infiltrado inflamatorio y pérdida de la arquitectura alveolar normal. Las lesiones incluían

descamación y necrosis del epitelio alveolar y bronquial y la presencia de cuerpos de inclusión intranucleares (Figura 13). La IHQ fue positiva en áreas de la región apical del epitelio bronquial y bronquiolar (Figura 14). En todos los casos, los pulmones de los animales no infectados presentaron características histológicas normales.

Útero y placenta

Grupo a (hembras preñadas infectadas):

Los cambios histológicos encontrados en los úteros de los animales inoculados con todas las cepas y sacrificados a los 10 días de preñez fueron muy heterogéneos. Se encontraron órganos con endometritis leve, con predominio de mononucleares o de polimorfonucleares según el caso, otros con ligera congestión y edema y algunos no presentaron alteraciones detectables.

En los cortes histológicos de útero teñidos con H-E se encontraron lesiones muy marcadas en los ratones inoculados con las cepas AR2, AR3, AR8. Los úteros de los ratones inoculados con la cepa AR2, presentaron gran cantidad de células apoptóticas en el tejido conectivo, en la luz y las glándulas, cuerpos apoptóticos y descamación del epitelio. En algunos cortes pudieron observarse abundante cantidad de macrófagos, de focos de necrosis y de leucocitos polimorfonucleares. (Figuras 15 y 16)

En el caso de los controles (Grupo c) sacrificados a los 10 días de preñez se observaron escasas células apoptóticas y una extensa zona de remodelación epitelial. (Figura 17)

Con respecto a las ratonas del Grupo a inoculadas con la cepa AR3 sacrificadas a los 10 días de preñez se observaron abundantes células apoptóticas en el útero. Sin embargo, la placenta y la decidua fueron de apariencia normal. En algunos de los animales se detectaron en el útero una gran cantidad de células inflamatorias, células apoptóticas en el tejido conectivo y un alto número de cuerpos apoptóticos.

Las ratonas inoculadas con la cepa AR8 presentaron abundante cantidad de neutrófilos y reabsorción con zona de necrosis. La placenta presentó apariencia normal en la mayoría de los casos, sin embargo en algunos de los animales se detectaron áreas con leucocitos polimorfonucleares abundantes y una zona de congestión. No se encontró una relación importante entre el grado de las lesiones y la detección de virus por AV y PCR en los úteros de las ratonas infectadas. (Figura 18)

En todos los animales no inoculados el útero y la placenta presentaron las características morfológicas típicas del día de gestación. (Figura 19)

El uso de las técnicas de PAS y la lectinohistoquímica con DBA, permitió reconocer las células glandulares granulares metriales. Estas células solo fueron reconocibles en los animales preñados. Por lo tanto en la cepa AR2 que generó pérdida de la preñez en todos los casos no pudieron analizarse, para la cepa AR3 en las hembras preñadas los valores fueron semejantes a los hallados en los controles. (Gráfico 1, Figuras 20 y 21)

Con las técnicas de Giemsa y la inmunohistoquímica anti c-kit se reconocieron los mastocitos, el número de estas células no cambio ni en el mesometrio ni en la totalidad de las capas de las hembras infectadas con las cepas AR 3 y AR8. (Gráficos 2 y 3, Figuras 22 y 23)

3.3 ANÁLISIS DE LAS SECUENCIAS AMPLIFICADAS.

El análisis genómico realizado sobre la región intergénica ubicada entre el ORF 62 y el ORF 63, muestra que, en el sector correspondiente a la misma existe un alto porcentaje de identidad entre cepas. En trece cepas argentinas (AR8, AR7, AR4, AR2, AR3, AR10, AR9, AR18, AR20, AR15, AR19, AR21, AR22) se encontraron inserciones de 18 bp ubicadas en las posiciones en la posición 109168 bp, mientras que en la cepa AR6 se encontró una inserción de 9 bp en la misma posición. (Figura 24)

Los restantes sectores analizados presentaron un alto porcentaje de identidad entre cepas.

Los sectores genómicos ubicados entre las posiciones 108803 y 110385, presentaron un porcentaje de identidad que oscilo entre el 99% y el 100%.

Las porciones genómicas analizadas fueron unidas para la construcción de un único *dataset* utilizado posteriormente en el análisis filogenético.

El *dataset* presentó 1510 sitios de los cuales solo 13 fueron variables. La composición nucleotídica del mismo fue de T= 27,4 %, A= 26,1 %, C= 21,3 %, y G= 25,2 %. (Figura 25)

3.3.1. Caracterización genética.

Los principales trabajos sobre diversidad genética realizados en EHV-1 se han basado en el análisis del sector genómico correspondiente a la glicoproteína G (gG) mediante la construcción de matrices de distancias evolutivas utilizando el modelo K2P y la obtención de redes o mediante la aplicación del algoritmo de NJ, utilizando un número muy limitado de cepas (Pagamjav et al 2005).

En esta tesis se genotipificaron 22 cepas argentinas provenientes de equinos con diferente signología mediante PCR y secuenciación de las porciones genómicas comprendidas entre 108803 y 110385, respectivamente, de acuerdo a la cepa de referencia Ab4.

Los virus se separaron de acuerdo a la signología relacionada: abortos, enfermedad neonatal, enfermedad respiratoria, síndrome neurológico.

Los cuatro pares de cebadores utilizados amplificaron adecuadamente los sectores genómicos de interés. La Figura 25 presenta el alineamiento de las secuencias obtenidas.

El porcentaje de identidad (porcentaje de nucleótidos idénticos a lo largo del sector estudiado) entre aislamientos argentinos, entre aislamientos argentinos y extranjeros y entre aislamientos extranjeros varió entre el 99 y el 100% (Figura 26)

El análisis de distancias genéticas reveló que las cepas argentinas AR1, AR14, AR 11, AR 16, AR17, AR 6 y AR 12 se agrupan con las cepas extranjeras JA, UK1 y UK2. El análisis muestra que dentro de este grupo podemos identificar un subgrupo constituido por la cepa argentina AR6 y la cepa británica UK2 (Figura 27). Los aislamientos incluidos en este subgrupo fueron aislados a partir de animales con diferente signología.

La similitud global entre aislamientos argentinos osciló entre el 99 % y el 100 %, la similitud global entre aislamientos extranjeros arrojó valores similares.

3.3.2. Análisis filogenético.

El análisis filogenético de las 25 cepas de EHV-1 aisladas en Argentina y en otras partes del mundo, se realizó mediante Máxima Parsimonia y Máxima Verosimilitud, con el objetivo de reconstruir la historia evolutiva de las cepas argentinas de EHV-1 y analizar la evolución de los signos clínicos mediante el mapeo de los mismos sobre la hipótesis

filogenética aceptada. La cepa NS80567 correspondiente a la especie *Equid Herpesvirus 4* (EHV-4) fue utilizada como outgroup (OG).

Análisis por Parsimonia

El análisis por parsimonia fue realizado aplicando pesos iguales.

Las búsquedas heurísticas se realizaron partiendo de 1000 árboles iniciales. Teniendo en cuenta que el reordenamiento de un árbol contribuye a la obtención de árboles de igual valor de optimalidad, los ciclos de búsqueda y el reordenamiento del árbol mediante *branch swapping* fueron realizados mediante la aplicación del algoritmo TBR disponible en el programa TNT.

A partir del análisis de nuestros datos mediante la aplicación del criterio de máxima parsimonia con pesos iguales se obtuvo un único árbol de 771 pasos de longitud.

En este árbol pueden identificarse 2 grupos monofiléticos, el primero integrado exclusivamente por las cepas argentinas AR9, AR7, AR3, AR4, AR18, AR15, AR 20, AR22, AR19 y AR21. En este grupo podemos identificar 3 clados, el primero integrado por las cepas AR3 y AR4, el segundo integrado por las AR20 y AR22, y el tercero conformado por las cepas AR19 y AR21.

El segundo grupo monofilético posee 4 clados, el primero constituido por las cepas AR12 y AR16, el segundo conformado por las cepas AR17 y AR14, el tercer grupo está constituido por la cepa JA originaria de Japón y la cepa AR11, y el cuarto clado integrado por las cepas británicas UK1 y UK2 (Figura 28).

Máxima Verosimilitud.

Como se mencionó en el Cap 1 el método de máxima verosimilitud permite identificar el árbol más probable para un set de datos dado un modelo evolutivo.

El programa *FindModel* (www.hiv.lanl.gov/findmodel.htm), es un software libre disponible *on-line* basado en el programa Modeltest, el cual permite estimar un modelo evolutivo a través del test de razón de verosimilitud (LTR).

La estimación del modelo evolutivo lo realiza utilizando una topología obtenida mediante el método de NJ a partir de la matriz de datos que estamos analizando.

Mediante la aplicación de este programa se obtuvo el modelo de evolución de HKY85, este modelo como se mencionó en el Cap. 1, asume distintas frecuencias de bases y distintas tasas de tv y ti.

La razón de Ti/Tv fue de 4.0277991. Por lo expuesto anteriormente, podemos inferir que la forma en que evoluciona el sector genómico estudiado se ajusta a un modelo en el cual Ti y Tv ocurren con diferente frecuencia y además existe una variación en la tasa de cambio de cada posición de la secuencia. La frecuencia de aparición de cada base es diferente.

La obtención de un cladograma mediante ML insume una gran cantidad de tiempo computacional, debido a la gran cantidad de cálculos que realiza por árbol evaluado. Por este motivo, es conveniente realizar una búsqueda heurística menos intensa que en parsimonia. En el análisis por ML, se reordenó el árbol obtenido por RAS sin establecer límites al número de árboles retenidos.

Se obtuvo 1 árbol no resuelto, en el cual solo puede identificarse el grupo constituido por las cepas AR11, US, AR12 y AR16, dentro del mismo puede identificarse el grupo formado por las cepas AR12 y AR 16 (Figura 29).

Cálculo de valores de confianza.

El soporte estadístico de los grupos se estableció mediante la realización de un análisis de *bootstrap* y *jackknife*, utilizando parsimonia debido a que los tiempos computacionales que insume el cálculo de valores de soporte en árboles obtenidos mediante *maximum likelihood* es sumamente intensivo, teniendo en cuenta la capacidad computacional de los procesadores.

En las Figuras 30 y 31 se muestran los valores obtenidos a partir de 1000 pseudomuestras, por cada pseudomuestras se aplicaron 1000 RAS + TBR *branch swapping*.

Se observa que el grupo formado por las cepas AR18, AR15, AR19, AR21, AR20, AR22, presenta valores de *bootstrap* y *jackknife* muy bajos. Mientras que el grupo formado por las cepas AR6, JA, US, AR11, AR1, UK1, UK2, AR17, AR13, AR14, AR12, AR16, presentan valores de *bootstrap* y *jackknife* altos. Los valores de estos test son considerados significativos cuando superan el 70 %. Dentro de este grupo podemos encontrar a los clados UK1 y UK2 y el clado AR12 y AR 16 con valores de *bootstrap* y *jackknife* inferiores a 70.

De acuerdo a lo observado en este análisis en la mayoría de los casos, los valores de confianza de los grupos son coincidentes con las variaciones observadas en los árboles obtenidos con distintas metodologías.

Mapeo de caracteres no moleculares.

El procedimiento de mapeo de caracteres sobre un cladograma utilizando parsimonia como criterio de optimalidad, permite reconstruir la evolución de un carácter dentro del grupo en estudio. Este procedimiento (mapeo u optimización) provee información sobre el número de veces que se originan los distintos estados de carácter, la secuencia de transformación y la condición ancestral del mismo (Schuch, 2000).

Como describimos en el Cap 1, la infección causada por EHV-1 se asocia con diferentes signos clínicos. Otros autores han intentado correlacionar la presencia de inserciones y deleciones en el sector genómico estudiado en este trabajo con la signología producida por EHV-1.

Para realizar esta evaluación mediante el mapeo se considera a la signología como un carácter y se mapeó sobre el cladograma aceptado como hipótesis de relación.

El mapeo u optimización fue realizado mediante la utilización del programa *Winclada* utilizando la opción *unambiguous*.

Para el carácter signos clínicos se consideraron los siguientes estados; **enfermedad respiratoria, abortos, enfermedad neurológica y enfermedad neonatal**. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 32. Nuestro análisis indica que la enfermedad neonatal causada por la infección por EHV-1 se desarrolló de manera independiente, mientras que el aborto es la condición ancestral para el grupo.



4. DISCUSIÓN

De acuerdo a los objetivos enunciados oportunamente podemos observar que este trabajo consta de dos partes fundamentales: la primera de ellas pretende relacionar la estructura genómica de las cepas de EHV-1 con variaciones en su virulencia utilizando el modelo experimental BALB/C. La segunda parte de esta tesis está dirigida a establecer hipótesis sobre las relaciones filogenéticas que reflejen la evolución de las cepas argentinas de EHV-1.

Para el desarrollo de la primera de las partes se eligió el modelo BALB/C fundamentándonos en el hecho de que desde hace mucho tiempo por razones prácticas, éticas y humanas se han desarrollado modelos de animales para su aplicación en investigaciones biomédicas. Los modelos animales se definen como "*organismos vivientes con una inherente adquisición natural a procesos patológicos inducidos o espontáneos que de una u otra manera semejan el mismo fenómeno ocurrido en el huésped natural*". (Marquez, 1997). Los animales de laboratorio son modelos muy convenientes y herramientas útiles para utilizar en el estudio de muchas enfermedades de origen viral. En el caso de medicina veterinaria y sobre todo cuando se trata de grandes animales el uso del huésped natural para estudiar aspectos patogénicos e inmunológicos de una infección, muchas veces se torna dificultoso tanto por el manejo laborioso de estos animales como también por el costo que ello implicaría.

En relación con la primera parte, los estudios genómicos de las cepas analizadas utilizando ER y tal como lo expresan los resultados, permitieron determinar que no existen mayores diferencias entre las cepas.

La cepa AR1 ya había demostrado mayores variaciones y estos resultados ya fueron difundidos en trabajos previos publicados (Galosi et al., 2004; Galosi et al., 1998a, 1998b).

No se detectaron fragmentos genómicos derivados de recombinación entre virus salvajes y provenientes de vacunas atenuadas contrariamente a los datos hallados por Palfi y Christensen (1995) y Meyer y colaboradores (1992).

Al igual que en el trabajo realizado por Kirisawa et al. (1994) no se observó variabilidad en el fragmento *Bam*HI "g" indicando que este fragmento es altamente estable.

Debido a las pequeñas variaciones observadas en el fragmento *Bam* HI "e" y *Bg*III "m" se seleccionó a la IR entre el ORF 62 y ORF 63, la cual se ubica dentro de

estos fragmentos y, de acuerdo a estudios realizados por otros autores, estaría relacionada con la virulencia de las cepas y el crecimiento viral *in vitro*. (Ibrahim et al., 2004). Por este mismo motivo se seleccionaron las cepas AR2, AR3 y AR8 para los estudio de virulencia en el modelo ratón.

Estudios de virulencia. Luego de la inoculación experimental fue reproducida la signología clínica característica. El AV y los cambios histológicos hallados en las muestras de pulmón del grupo control positivo de infección desde las 24 h pi hasta el 4° día pi demostraron una activa multiplicación del virus. Las lesiones encontradas en el pulmón fueron semejantes a las encontradas en trabajos previos por otros investigadores (Awan et al., 1990; Awan et al., 1991; Bartels et al., 1998, Walker et al., 1998, Walker et al., 1999) y por nuestro grupo (Galosi et al., 2004, Galosi et al., 2006)

La disminución del peso corporal es un parámetro muy útil para evaluar la patogenicidad de diferentes cepas en el ratón. En este estudio se observó que a diferencia de los datos obtenidos para la cepa AR1, las restantes cepas produjeron una baja del peso corporal en las primeras 48 hs para luego retomar la curva normal de incremento. En otros trabajos (Iwai et al., 1998) no se encontró un descenso inicial del peso corporal en hembras preñadas, pero en esos casos la infección se realizó en etapas posteriores de la preñez.

En ninguno de los casos se observaron signos nerviosos, hallazgos que sí obtuvieron otros autores en trabajos previos (Frampton et al., 2004)

En relación a la detección de virus en sangre (viremia) las experiencias de Smith y Borchers (2001) demostraron que el virus es transportado por los leucocitos y puede ser aislado. Otros autores (Awan et al., 1991) sin embargo hicieron referencia a que es muy poca la cantidad de partículas virales que se unen o se transportan en los leucocitos y no siempre el AV a partir de los mismos es posible. En esta experiencia no fue positivo el AV ni la detección de ADN viral por PCR a partir de las muestras de sangre extraídas. Esto concuerda con las afirmaciones de los autores que hacen referencia también al corto período de viremia para el equino y a que la recuperación de virus a partir de leucocitos no siempre es exitosa (Smith, 1997).

Probablemente en este modelo experimental, y para determinar el momento exacto de recuperación viral y la duración de la viremia como así también estudiar las variaciones de los diferentes tipos celulares involucrados en la inmunidad mediada por células, deberían tomarse las muestras de sangre en intervalos más estrechos en las primeras 24 h, lo que en nuestro caso constituía un riesgo ya que podría haber llevado a

los animales a un aborto espontáneo o muerte por estrés traumático con modificaciones de los resultados. Para tener datos certeros sobre el momento de mayor circulación de virus en sangre, consideramos que se debería trabajar primero con el modelo respiratorio en animales no gestantes y establecer de esa manera los tiempos de toma de las muestras seriadas de sangre para evaluar los parámetros anteriormente mencionados.

El AV fue positivo a partir del útero con 3 cepas estudiadas, sin embargo el virus no pudo ser recuperado por AV ni detectado por PCR a partir de los embriones.

La explicación a este fenómeno la señala Smith (1997) en su trabajo donde hace referencia a que muchas veces en el huésped natural, el equino, se observan abortos sin poder aislarse el virus de las placentas las que a veces no presentan lesiones, como así también en otros casos se detectan placentas infectadas y fetos libres de virus.

Esto se debe fundamentalmente al endoteliotropismo de algunas cepas de EHV-1 que hace que se comporten de manera diferente. Si la cepa es muy endoteliotrópica se producen múltiples lesiones a nivel de la placenta que llevan a la rápida expulsión del feto el que en la mayoría de las veces resulta negativo al virus. En caso de cepas menos endoteliotrópicas, las lesiones son menores y de esta forma al prolongarse el contacto madre-feto el virus alcanzaría al feto lo que resultaría luego en un feto virológicamente positivo o en un neonato que muere por depresión general en las primeras 24-48 hs de vida a raíz de la infección sistémica.

Con los datos que se obtuvieron no pudieron observarse mayores diferencias que permitieran determinar mayor o menor virulencia de las mismas excepto con la cepa AR1 datos que fueron publicados oportunamente (Galosi et al., 2004).

Desde el punto de vista histológico, hasta el momento en las ratonas preñadas infectadas con EHV-1 no se habían publicado cambios patológicos en los úteros, en cambio en la placenta se habían detectado congestión en el trofoblasto, isquemia y consecuente necrosis con reducción del tejido trofoblástico normal (Awan and Field, 1993; Awan et al., 1995; Walker et al., 1998; Walker et al., 1999). Estos resultados coincidían con lo encontrado en la placenta equina, en la que se determinó la presencia de congestión y necrosis del corion y hemorragias petequiales en el estroma (Smith et al., 1997, 2001). En nuestro trabajo, encontramos algunas lesiones congestivas en la placenta, semejantes a las previamente descriptas. Sin embargo en la presente tesis se encontraron lesiones endometriales de severidad diversa, cuya intensidad dependió de la cepa analizada. En nuestra búsqueda bibliográfica no encontramos datos previos sobre endometritis y lesiones vasculares del endometrio asociadas a la infección con EHV-1

en modelos de ratón, a diferencia de lo que ocurre en las publicaciones derivadas de trabajos en equinos, en los que se mencionan lesiones vasculares e inflamación en el endometrio (Smith and Borchers, 2001). Este resultado puede relacionarse con los hallazgos realizados en abortos equinos por Smith y colaboradores (2004), quienes encontraron casos en donde las lesiones estaban total o casi totalmente restringidas a la placenta y en varios de ellos se encontraba afectado el endometrio, lo que demuestra una gran variación de los efectos sobre el endometrio según la cepa. Además muchos de los trabajos previos utilizan un momento más tardío de la preñez murina para realizar su estudio (Awan et al., 1995). Allen y colaboradores (1998), proponen como un mecanismo fundamental para el aborto en yegua la lesión del endotelio uterino producida por los propios mecanismos de defensa del organismo

Las placentas de los mamíferos euterios constituyen, sin lugar a dudas, el órgano que mas variaciones presenta dentro de estos animales (Barbeito, en prensa 2009). A pesar de que las placentas de equino y de ratón son diferentes desde un punto de vista histológico (epiteliocorial/endoteliocorial transitoria y hemocorial respectivamente) en ambos tipos de placenta el reclutamiento de células inmunes y la expresión de citoquinas y receptores presentan similitudes por lo que se cree que los mecanismos inmunológicos y patogénicos pueden ser comparables entre placentas hemocoriales y epiteliocoriales lo que convalida el uso de modelos murinos. Esto queda reafirmado en el presente trabajo en el que encontramos las lesiones en el útero descritas previamente en el caballo pero no en el ratón

En el ratón existen numerosos mecanismos inmunológicos locales modulados por los tejidos extraembrionarios y por células maternas que intervienen en la respuesta inmune local durante la preñez, entre ellos se encuentran células presentadoras de antígenos, linfocitos Th1, Th2 y Treg, células NK uterinas y diversos factores humorales y hormonales que promueve el normal desarrollo de la gestación y a la vez previenen las infecciones locales (Wegman et al., 1993, Chauoat et al., 2004; Zenclunsen et al., 2007). El balance entre las distintas citoquinas es fundamental para la supervivencia del feto en el útero materno y para la protección frente a infecciones locales. Durante la implantación, la placentación y buena parte del primer tercio de la preñez, hay un predominio de las denominadas citoquinas proinflamatorias (o Th1) como INF γ , TNF α e IL-8 que luego son reemplazadas por un perfil Th2,3 o inmunosupresor dominado por IL10, IL4, TGF β . A medida que se acerca el final de la

preñez se inicia una respuesta proinflamatoria sistémica. Una característica fundamental de estos mecanismos es su redundancia y su efecto sinérgico (Chaouat 2007).

Las células NK aparecen modificadas en el útero preñado de distintas especies de mamíferos (Parr et al., 1991) En el ratón, las NK uterinas tienen un pico cerca del fin del segundo tercio y luego decaen (Mor et al., 2003). Estas secretan y expresan muchas citoquinas (IL8, IL10, TNF α , IFN γ), moléculas inmunomoduladoras (Gal 1) y factores de crecimiento (PIGF, VEGF). A su vez establecen una interacción inmunoestimuladora con células dendríticas inmaduras, sobre las que inducen a la secreción de IL10 (Karimi et al., 2008). Las células NK uterinas son necesarias para una placentación normal (Croy et al., 2006) EL interferon gamma es una citoquina de tipo TH1 cuya función varía a lo largo de la preñez murina (Zenclussen et al., 2007). En los animales de granja esta sustancia parece estar relacionada, aunque no sería la causa directa de la pérdida de la preñez que ocurre en algunas enfermedades infecciosas (Rosbotton et al., 2008). En yeguas preñadas infectadas con EHV-1 se determinó un incremento de los linfocitos circulantes productores de esta citoquina (Paillot et al., 2007) sin embargo no se han realizado estudios sobre la mencionada citoquina en la respuesta uterina frente a esta virosis. En la presente tesis se estudiaron las células NK uterinas o GMG, reconocidas como fuente de INF-gamma en en las ratonas preñadas (Zhang et al., 2003) y no se encontraron cambios en el número de las mismas en los animales infectados con la cepas AR3 y AR8 que mantuvieron la preñez. Por otra parte, estas células solo fueron detectables en los animales preñados. Por lo tanto, en la cepa AR2 que generó abortos en todos los casos, las GMG, no pudieron analizarse. Para la cepa AR3 en las hembras preñadas los valores fueron semejantes a los hallados en los controles. Este resultado difiere del encontrado en un modelo experimental en ratón para tritrichomonosis bovina en ratón, en ese caso se pudieron reconocer las GMG, aunque las mismas presentaban cambios degenerativos y necróticos en las animales que perdieron la preñez (Barbeito et al., 2008). Estos resultados sugieren que las NK uterinas no intervienen en la respuesta a EHV-1 a nivel uterino, esta observación difiere de lo encontrado para la respuesta sistémica a otros herpesvirus, ya que se sabe que las células NK contribuyen a la respuesta inmune en ratones infectados con Herpes virus simple humano (Nandakumar et al., 2008)

Los mastocitos son células fundamentales en el inicio de la respuesta inflamatoria, en el útero estas células presentan algunas características morfológicas y de distribución diferentes y además de su rol en la inmunidad innata, intervienen en la

regulación de la motilidad uterina (Gardfield et al., 2000), por lo que sus funciones durante la preñez son diversas y una alteración en su número también podría estar involucrada en la patogenia de la muerte embrionaria. Con las técnicas de Giemsa y la inmunohistoquímica anti c-kit se reconocieron los mastocitos, el número de estas células no cambio ni en el mesometrio ni en el miometrio de las hembras infectadas con las tres cepas, por lo que se desestima la posibilidad de que estas células intervengan en la pérdida del conceptus en nuestro modelo murino de herpesvirosis equina.

La muerte embrionaria fue observada en todos los casos de la infección con la cepa AR2, este resultado es coincidente con lo encontrado por Awan y colaboradores (1995) cuando inocularon virus en el mismo periodo de preñez. Sin embargo nosotros encontramos que el efecto letal sobre el *conceptus* es dependiente de la cepa ya que con las otras cepas se pudieron reconocer algunos embriones y placentas normales. Prickett (1969) determinó en equinos que la muerte prenatal por EHV-1 producida antes de los 6 meses de preñez, genera retención del conceptus y no aborto, en nuestro caso encontramos que en las cepas altamente patogénica existen muchos casos de pérdida de *conceptus* sin que se observe reabsorción.

Caracterización genética. En relación a la segunda parte de este trabajo tendiente a caracterizar genéticamente a las cepas y asociar la región analizada con algún cambio de virulencia con las cepas analizadas en el modelo experimental, podemos decir que el análisis genómico de la región intergénica (IR) ubicada entre el ORF 62 y el ORF 63, arrojó un porcentaje de identidad superior al 99% entre cepas. Solo se encontraron inserciones de 18 bp y 9bp en las cepas (AR8, AR7, AR4, AR2, AR3, AR10, AR9, AR18, AR20, AR15, AR19, AR21, AR22) y AR 6 respectivamente.

Ibrahim y colaboradores (2004) describieron cuatro dominios en la IR ubicada entre el ORF 62 y el ORF 63, en su trabajo los autores describen el primer y tercer dominio como conservados, mientras que el dominio 2 y el 4 fueron descriptos como variables. En las cepas analizadas por estos autores el segundo dominio presentó inserciones de 18 bp. En nuestro caso, las cepas analizadas en el segundo dominio presentaron inserciones de 18 bp en 13 cepas y en una única cepa la inserción fue de 9 bp, mientras que las 9 cepas restantes no presentaron dichos cambios. Con respecto al cuarto dominio las cepas analizadas en esta tesis presentan un alto grado de conservación. De acuerdo a nuestro análisis las cepas argentinas y británicas, la cepa norteamericana US y la cepa japonesa JA no presentan dominios variable. Por ende, en este caso, podríamos hablar de 4 dominios altamente conservados.

Análisis Filogenético. El análisis filogenético realizado mediante los métodos de parsimonia y *maximum likelihood* arrojaron resultados poco congruentes, exceptuando la identificación del grupo formado por las cepas argentinas AR12 y AR16 (Figuras 28 y 29). Con respecto a los valores de soporte también en general son bajos para este grupo y para los grupos obtenidos exclusivamente mediante el método de parsimonia, ya que los valores de *bootstrap* deben ser superiores a 70 para ser considerados significativos (Hillis & Bull, 1993) y mediante *jackknife* también se obtiene escasa resolución (Figura 30).

Todos los métodos resultaron coincidentes en el agrupamiento de las cepas AR12 y AR16 pero se obtuvieron valores de soporte de *bootstrap* y *jackknife* poco significativos para el mismo, 42 y 52 respectivamente. Este grupo por ende podría considerarse un grupo monofilético al igual que el formado por las cepas argentinas AR20 y AR 22 aunque en este caso los valores de soporte son extremadamente bajos. Sin embargo, este último grupo solo se ha identificado mediante el análisis realizado mediante parsimonia.

Mediante el mismo método las cepas argentinas AR11, AR12, AR13, AR14, AR16 y AR17 junto con las cepas británicas UK1 y UK2, la cepa japonesa JA y la cepa norteamericana US se agrupan juntas, por lo cual pueden considerarse un grupo monofilético, esto nos indica que las mismas tienen un ancestro común más cercano, este resultado esta soportado por altos valores de soporte. Dentro de este grupo se pueden identificar a los grupos formados por las cepas británicas UK1 y UK2 las cuales constituyen un grupo monofilético al igual que el grupo formado por las cepas AR12 y AR16. La relación de estos grupos con el resto de las cepas no ha podido ser establecido en este estudio. Desde una óptica evolutiva, esto podría deberse a distintas causas, entre ellas que los genotipos hayan aparecido casi al mismo en la historia del grupo quedando poca o ninguna evidencia de eventos de diversificación, otra posibilidad es que la región genómica analizada no contenga información filogenética relevante para resolver las relaciones filogenéticas en ese nivel taxonómico. Por último, no debe descartarse la posibilidad de que la aparición de las distintas cepas haya sido simultánea y por lo tanto un cladograma con politomias en ese nivel sea el que mejor represente la historia del grupo.

De acuerdo a nuestro análisis las cepas argentinas utilizadas en este trabajo constituyen un grupo polifilético. El origen polifilético de las cepas argentinas de EHV-

1 puede deberse al continuo de animales desde países donde EHV-1 es común. Sin embargo, considerando que las cepas extranjeras son escasas, estas cepas podrían también ser polifiléticas y pueden haber evolucionado anidadas dentro de las cepas argentinas.

Dentro de la Familia *Herpesviridae* se han realizado análisis filogenéticos mediante parsimonia, tal es el caso del análisis realizado con cepas pertenecientes a la especie *Herpes Simplex virus 1 (HSV-1)*, las cepas utilizadas fueron aisladas de un área geográfica restringida (oeste de Suecia) y de individuos caucásicos, además fueron incorporadas del Genbank dos cepas norteamericanas y cepas escocesas. Los resultados demostraron que las dos cepas norteamericanas y una cepa proveniente de Escocia están estrechamente relacionadas (Norberg, et al., 2004) Estos datos permitieron determinar las relaciones filogenéticas de las cepas de HSV-1 circulantes en un área restringida, pero sin embargo, constituye un paso importante para establecer las relaciones filogenéticas entre las cepas de HSV-1 distribuidas en todo el mundo.

Mapeo de caracteres no moleculares. El mapeo del carácter signos clínicos indica que la signología enfermedad neonatal, enfermedad respiratoria y enfermedad neurológica causadas por EHV-1 no están relacionadas con la evolución histórica del virus, nuestro análisis sugiere que la condición aborto es ancestral en las cepas de EHV.1, mientras que la condición enfermedad neonatal se desarrolló de manera independiente mediante evolución convergente (Figura 32) Este procedimiento sugiere también que la condición enfermedad neurológica constituye una “novedad evolutiva” en el grupo. Sin embargo, en este caso debemos tener en cuenta que existe una sola cepa que presenta dicha signología debido a que al momento de realizar este trabajo de tesis aún no habían sido caracterizados otros aislamientos argentinos como neuropatógenos (Vissani et al., 2008).

Nuestro análisis sugiere que la signología enfermedad neonatal, enfermedad respiratoria y enfermedad neurológica causada por EHV-1 pueden constituir un mecanismo de adaptación del virus a diferentes presiones ambientales de los tejidos.

Los factores que pueden actuar como diferentes presiones ambientales del hospedador pueden ser las diferentes células infectadas, diferentes poblaciones de Ac activos presentes en distintos tejidos las condiciones físico-químicas. Estos factores al actuar como diferentes presiones de selección, pueden incrementar la frecuencia de las variantes genéticas más eficientes en las nuevas condiciones ambientales.

La adaptación de las poblaciones ocurre gracias a la aparición y subsiguiente fijación de mutaciones beneficiosas. En las poblaciones con reproducción sexual, las mutaciones beneficiosas pueden recombinar y fijarse. En los sistemas asexuales, los linajes resultantes de la aparición de diferentes mutaciones beneficiosas compiten entre sí, y se fijan las de mayor efecto adaptativo (Martín Ocampos et al., 2009)

Nugent y colaboradores (2006), por ejemplo, encontraron que las cepas no neuropatogénicas de EHV-1 codifican A en la posición 2254 (aminoácido N752) del genoma, mientras que las cepas neuropatogénicas codifican G en esa posición (aminoácido D752). Esto sugiere que el virus EHV-1 ancestral probablemente codifica D752 y las variantes que expresan N 752 posiblemente tengan una ventaja adaptativa con respecto al resto.

El estudio de la evolución de un carácter mediante optimización en árboles filogenéticos ha sido muy útil en muchas disciplinas biológicas. Este enfoque (mapeo de caracteres) también ha sido utilizado en el estudio de la patogenia de otros virus, como es el caso de los *Pestivirus*, en este caso se estableció que la aparición de ciertos grupos monofiléticos coincidiría con un cambio en el tipo de patogenia asociada a la infección con el virus (Jones et al., 2004). En nuestro conocimiento, no se realizó hasta el momento el mapeo de la sintomatología producida por EHV-1 hasta ahora.

La reconstrucción de la historia evolutiva de los síntomas producidos por EHV-1, así como de otros integrantes de la Familia *Herpesviridae*, podría ayudar a un mejor conocimiento de los mecanismos patogénicos de las enfermedades producidas por estos agentes.

Este estudio constituye el primer análisis realizado en Sudamérica con cepas de EHV-1 para establecer las relaciones filogenéticas existentes entre las cepas así como reconstruir la historia evolutiva de los signos clínicos basado en el método de parsimonia. En resumen, este estudio focaliza en un aspecto muy importante de la evolución de los Herpesvirus que infectan perisodáctilos e intenta dar luz sobre la evolución de los signos, el cual constituye un tema de alto interés clínico.

Desde los puntos de vista clínico, inmunológico y virológico, la posibilidad de que un virus ocupe distintos nichos (e.g tracto respiratorio, sistema nervioso, sistema reproductivo) plantea nuevos factores a tener en cuenta. En primer lugar, la inmunidad de los distintos sistemas varía y por lo tanto también lo hace la patogenia de la enfermedad, esto sugiere que una vacuna efectiva contra la infección en alguna de sus localizaciones anatómicas no necesariamente será efectiva para otra. Esto nos obliga a

estudiar las distintas variantes que puede presentar la enfermedad, ya que la patogenia en cada sistema podría presentar características específicas.

5. Conclusiones



5. CONCLUSIONES GENERALES

- ✚ No se observaron mayores diferencias en el modelo experimental que pudieran determinar variaciones en la virulencia de las cepas.
- ✚ Se encontró por primera vez la existencia de lesiones uterinas en ratones infectados, las mismas son dependientes de la cepa.
- ✚ En nuestro modelo experimental, no se encontraron evidencias de cambios en los mastocitos y las células NK uterinas en esta infección.
- ✚ No pudieron relacionarse las variaciones genómicas con la virulencia de las cepas en el modelo experimental.
- ✚ Los estudios genómicos realizados en cepas de EHV-1 demostraron que las mismas presentan un alto grado de conservación en el sector genómico estudiado.
- ✚ De acuerdo a nuestro análisis filogenético, las cepas argentinas de EHV-1 analizadas en esta tesis constituyen un grupo polifilético. El continuo tránsito de animales desde países donde EHV-1 es común puede explicar la polifilia del grupo.
- ✚ Los signos clínicos enfermedad neonatal, enfermedad respiratoria y enfermedad neurológica causados por EHV-1 no están relacionados con la evolución histórica del virus. De acuerdo a nuestro análisis la aparición de los mismos está relacionado con un mecanismo adaptativo del virus ante diferentes presiones tisulares.



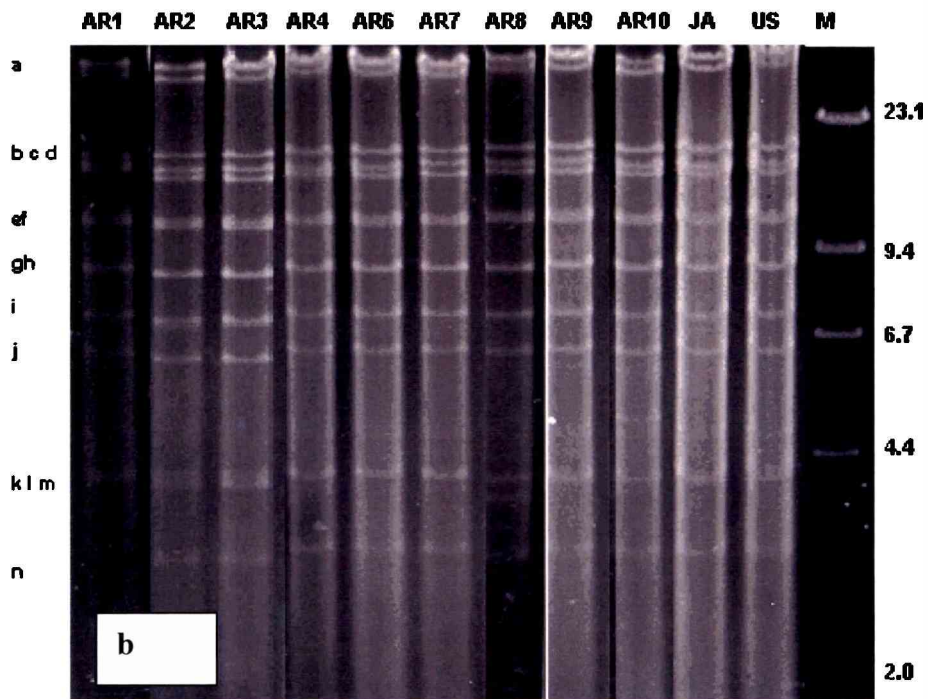
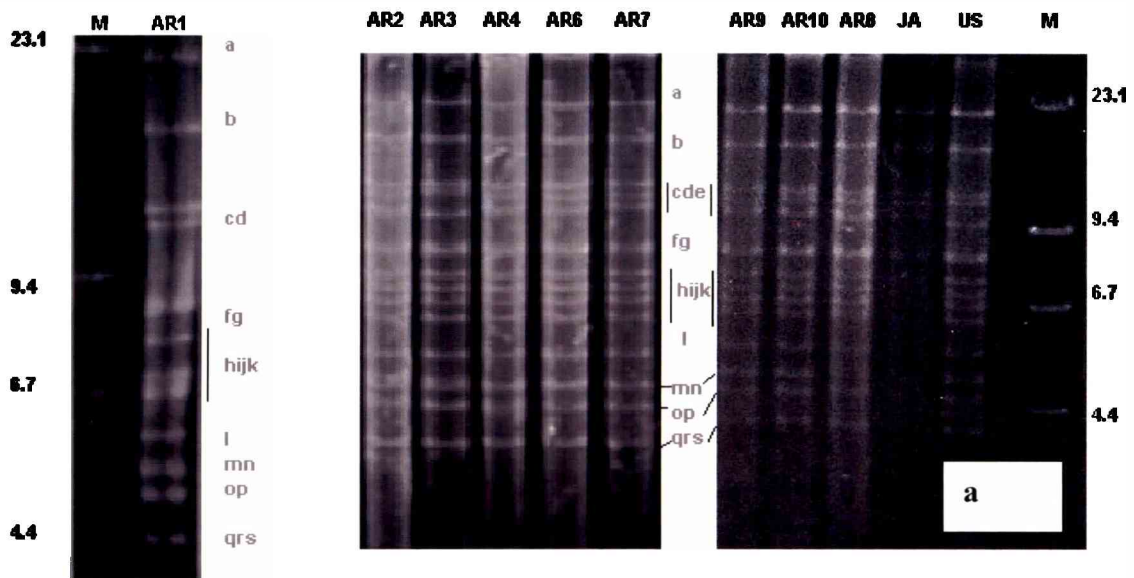


Fig. 10. Patrones de restricción de ADN obtenidos con *Bam*HI (a) y *Bgl*II (b) a partir de 9 cepas argentinas de EHV-1. M: marcador de peso molecular λ HindII (expresado en kilobases)

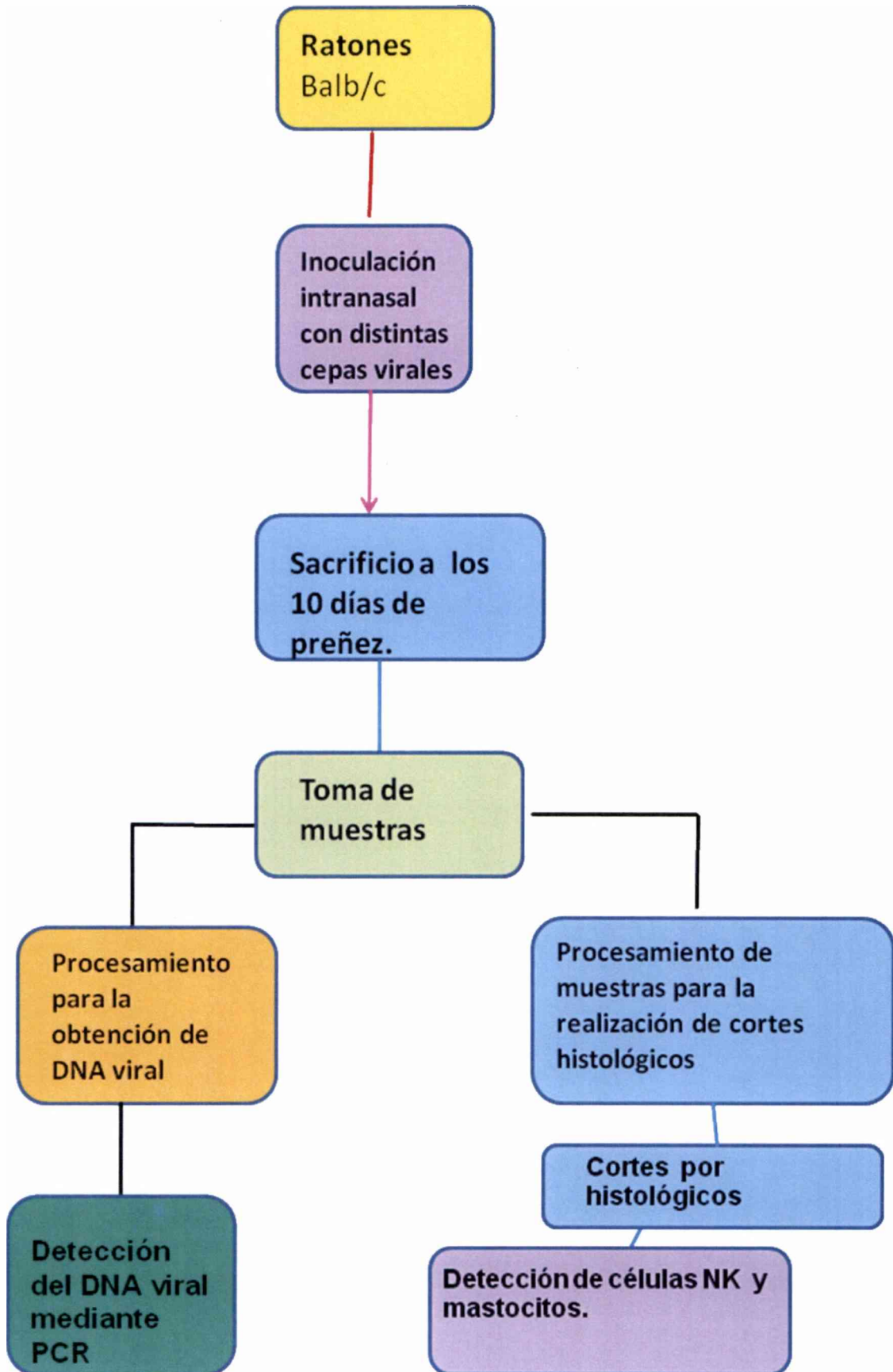


Diagrama de flujo en el que se muestra los pasos llevados a cabo para la realización de los preparados para detección de células NK y mastocitos.



Fig. 11. Ratón BALB/C infectado por EHV-1 (Observar el aspecto característico del pelo)

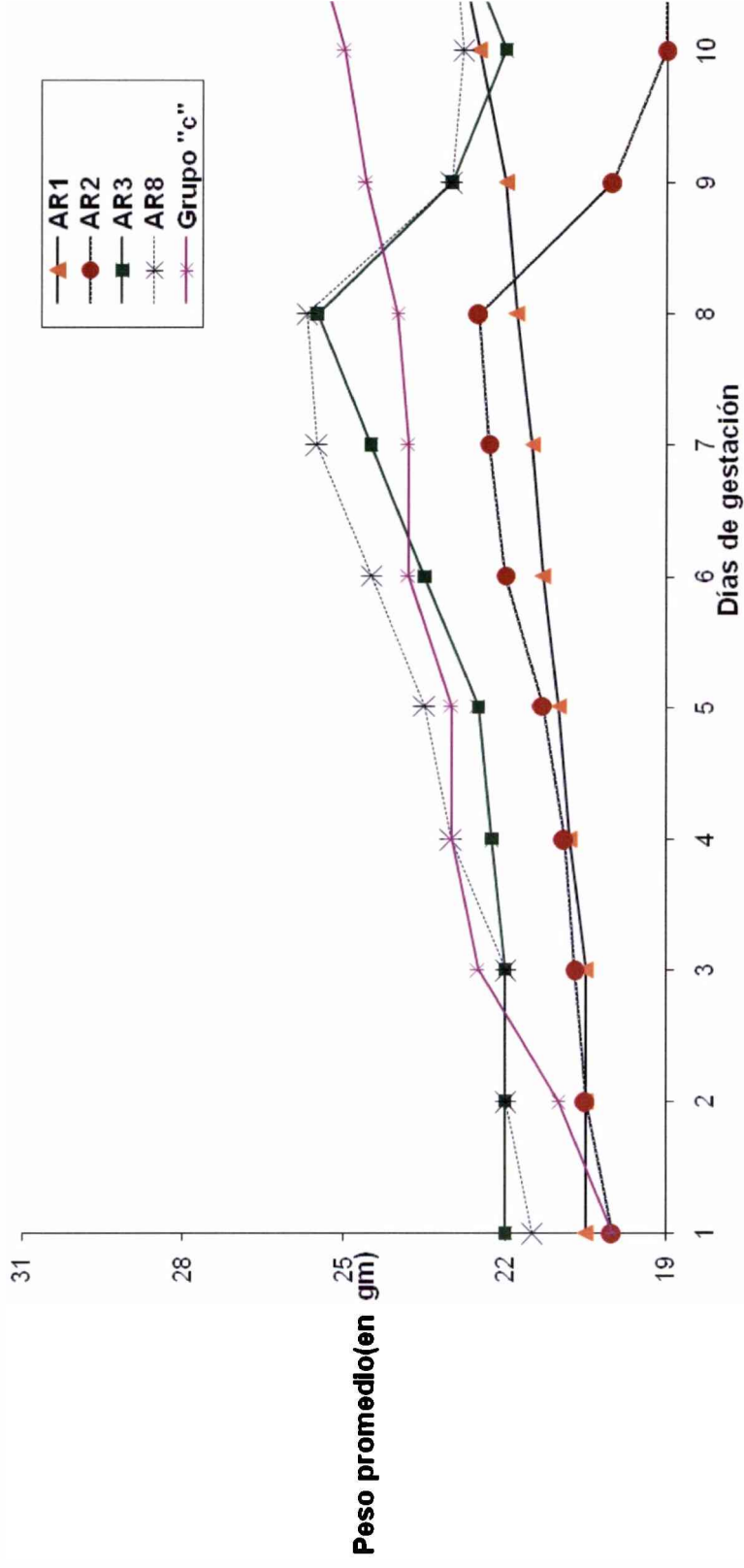


Fig.12. Curva de peso de hembras BALB/C Inoculadas vía Intranasal con $10^{6.5}$ DICT₅₀/ 50ul de las cepas de EHV-1 en estudio. Cada punto de cada serie representa el promedio obtenido con n=6 para el Grupo a y n= 18 para el Grupo c .

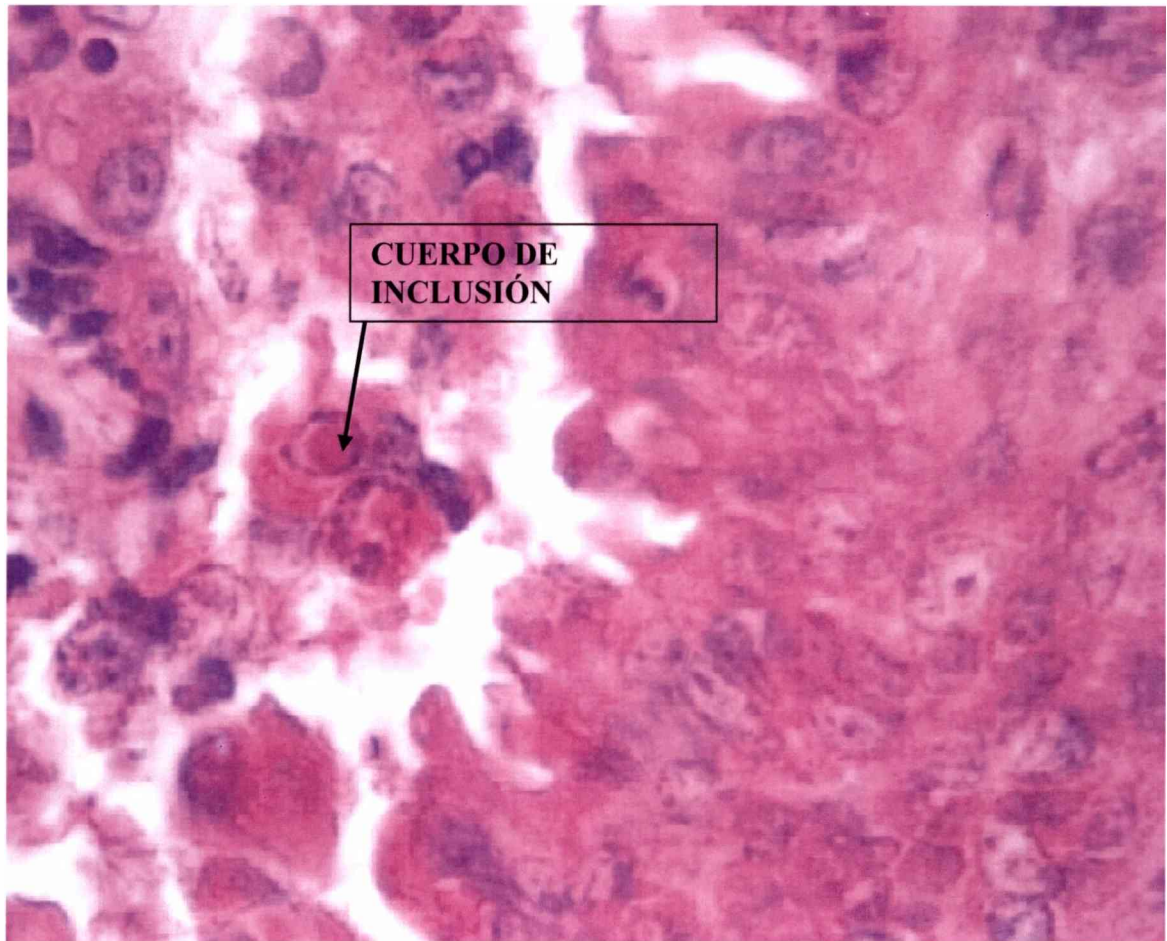


Fig.13. Corte de pulmón en animales inoculados con cepas de EHV-1. Se observa pérdida de la arquitectura alveolar normal con descamación y necrosis y la presencia de cuerpos de inclusión. HE 1000X

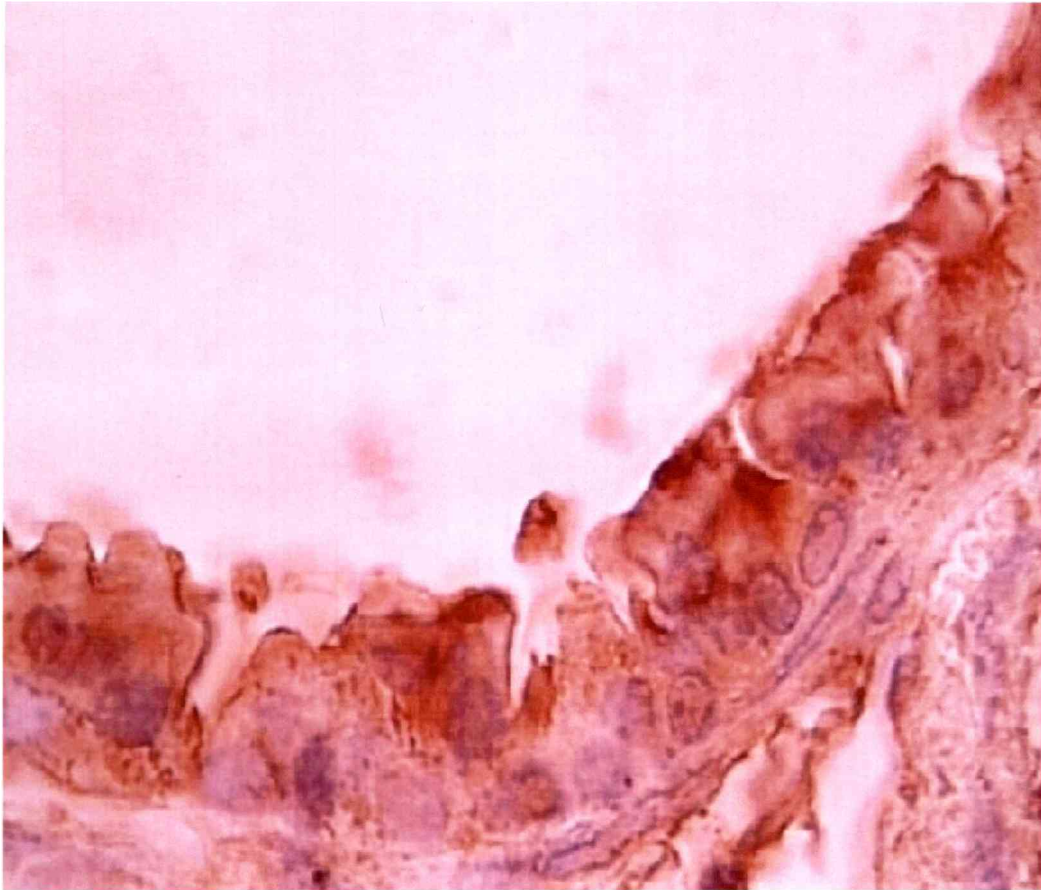


Fig.14. Cambios histopatológicos observados en áreas de la región apical del epitelio bronquial y bronquiolar en pulmón de BALB/C preñadas e infectadas con EHV-1 (IHQ)

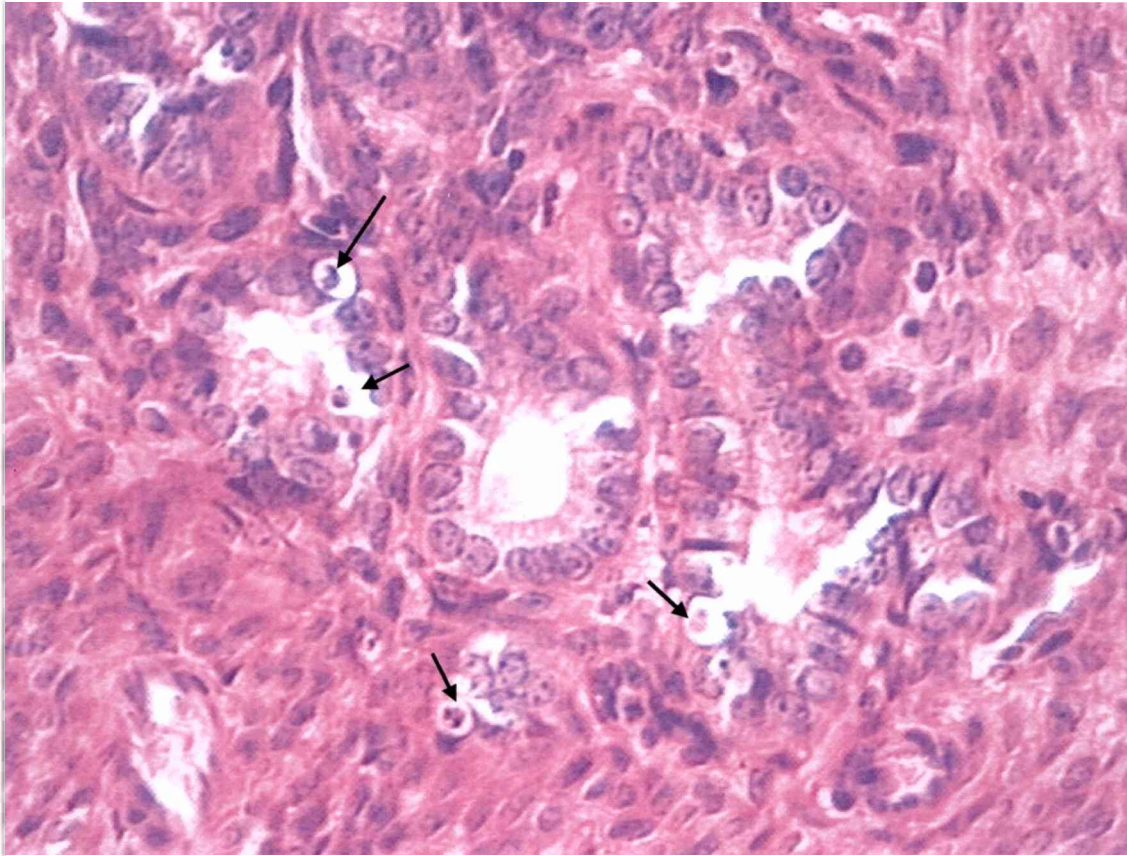


Fig. 15. Corte de útero en una hembra BALB/C infectada con la cepa AR2 de EHV-1. Las flechas señalan imágenes apoptóticas en las glándulas uterinas. HE 400 X.

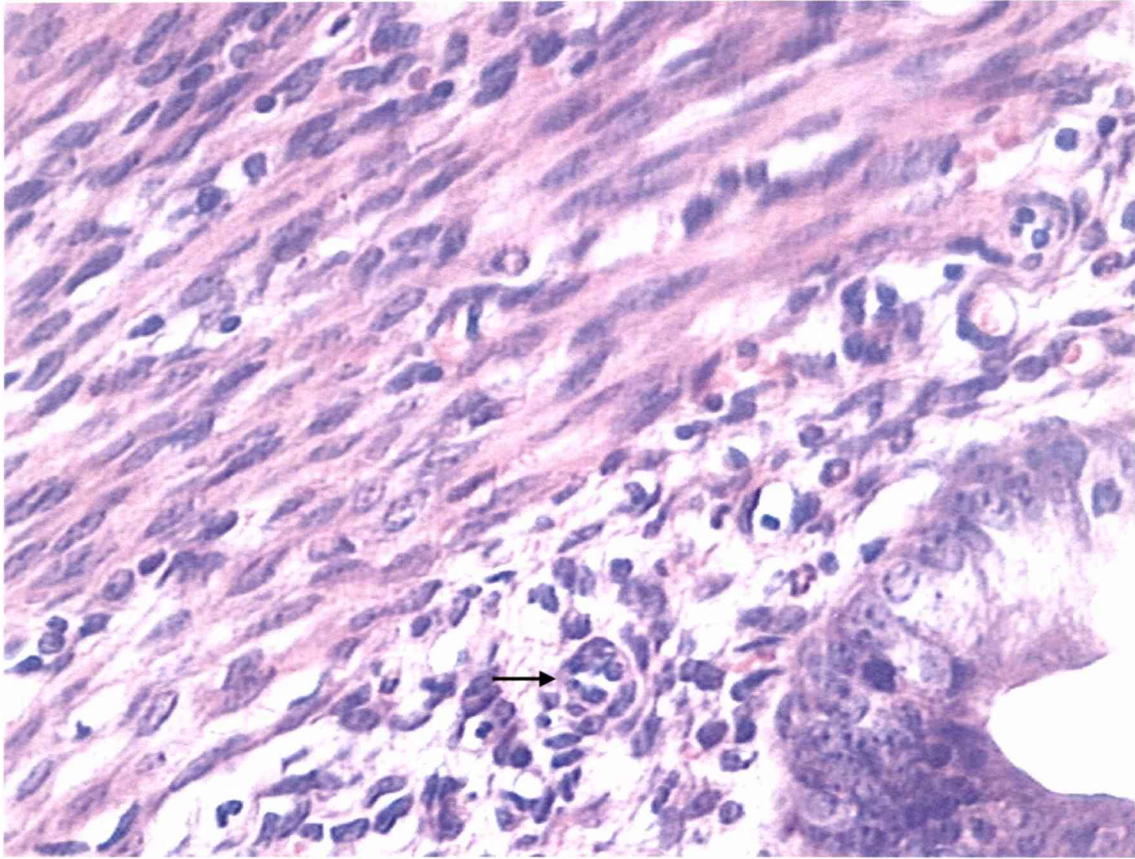


Fig. 16. Abundantes células inflamatorias en el endometrio de una hembra BALB/C infectada con la cepa AR2, fundamentalmente alrededor de algunos vasos sanguíneos. También se observan abundantes leucocitos en un vaso (flecha). HE 400X.

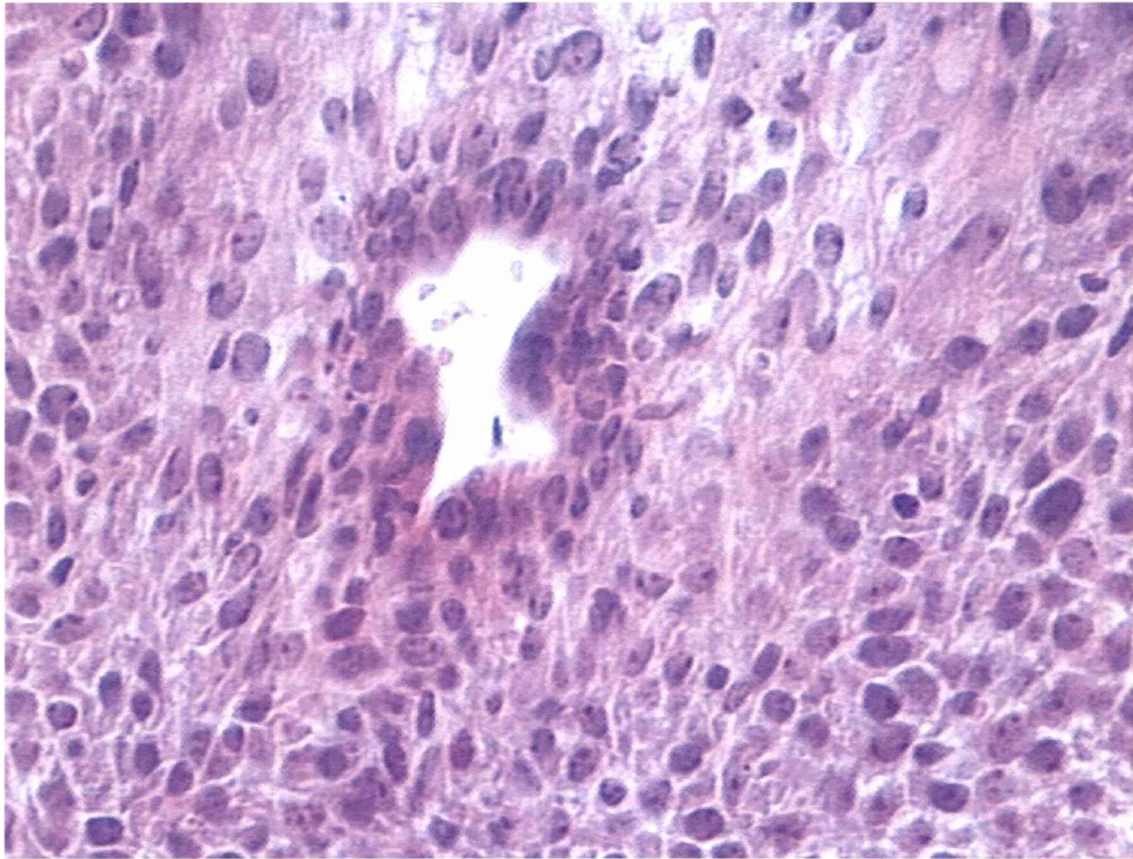


Fig.17. Útero normal de una hembra BALB/C preñada. HE 400X

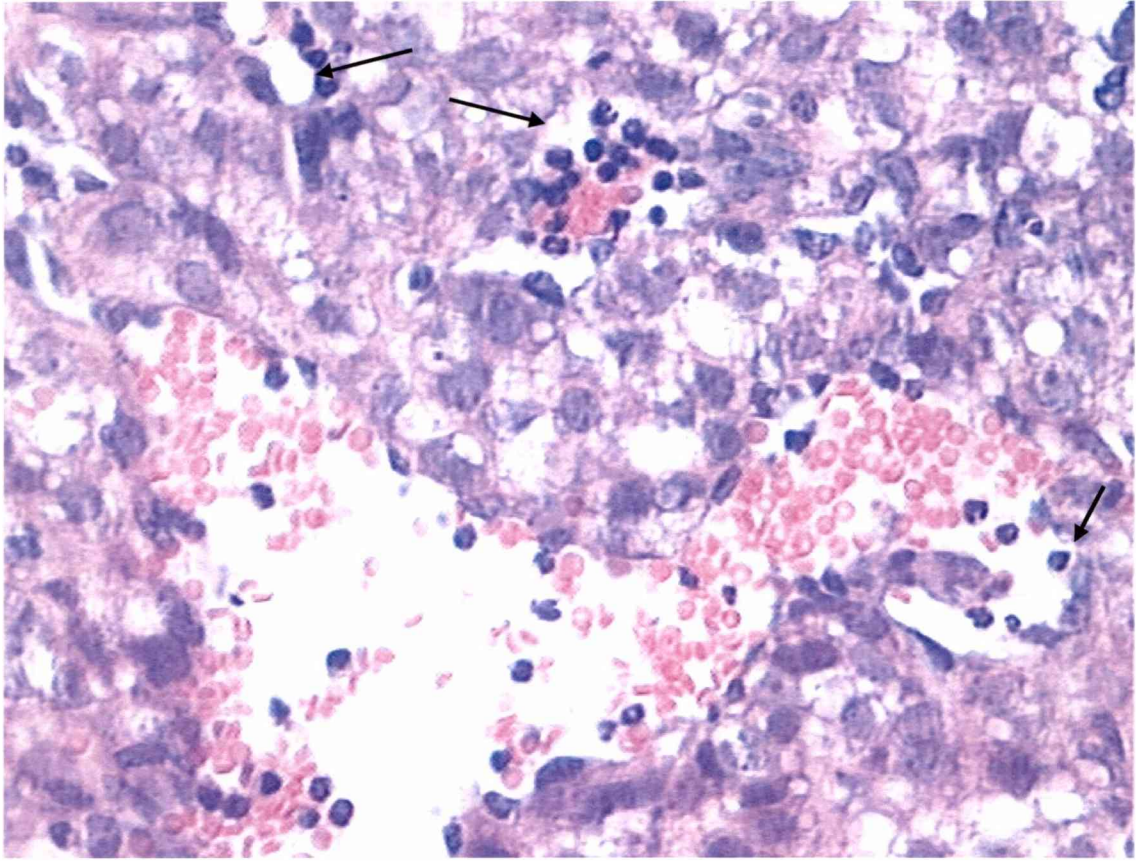


Fig.18 Placenta de una ratona BALB/C infectada con la cepa AR 8. Se observa gran cantidad de células inflamatorias especialmente alrededor de vasos (flechas). También se encuentran células inflamatorias marginándose y adhiriéndose a la pared de un vaso (flecha) HE 400X

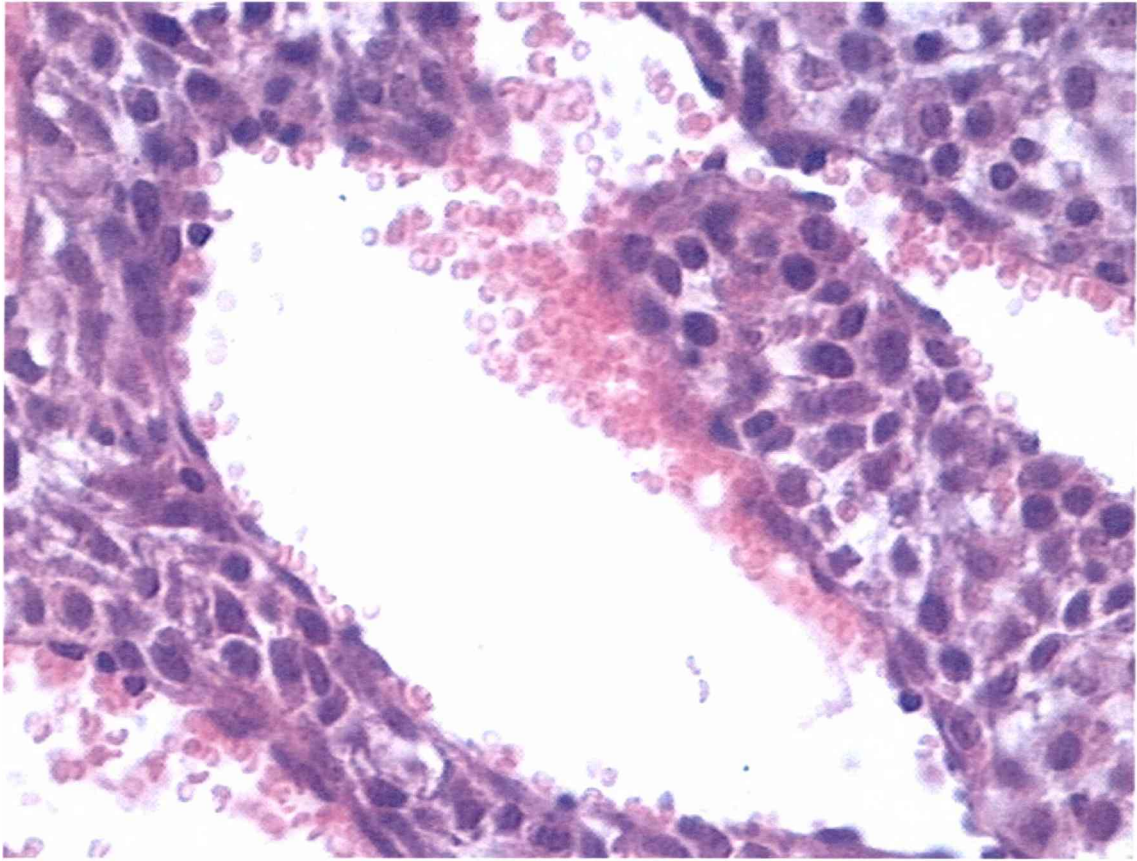


Fig. 19 Placenta de una ratona BALB/C con preñez normal. HE 400X.

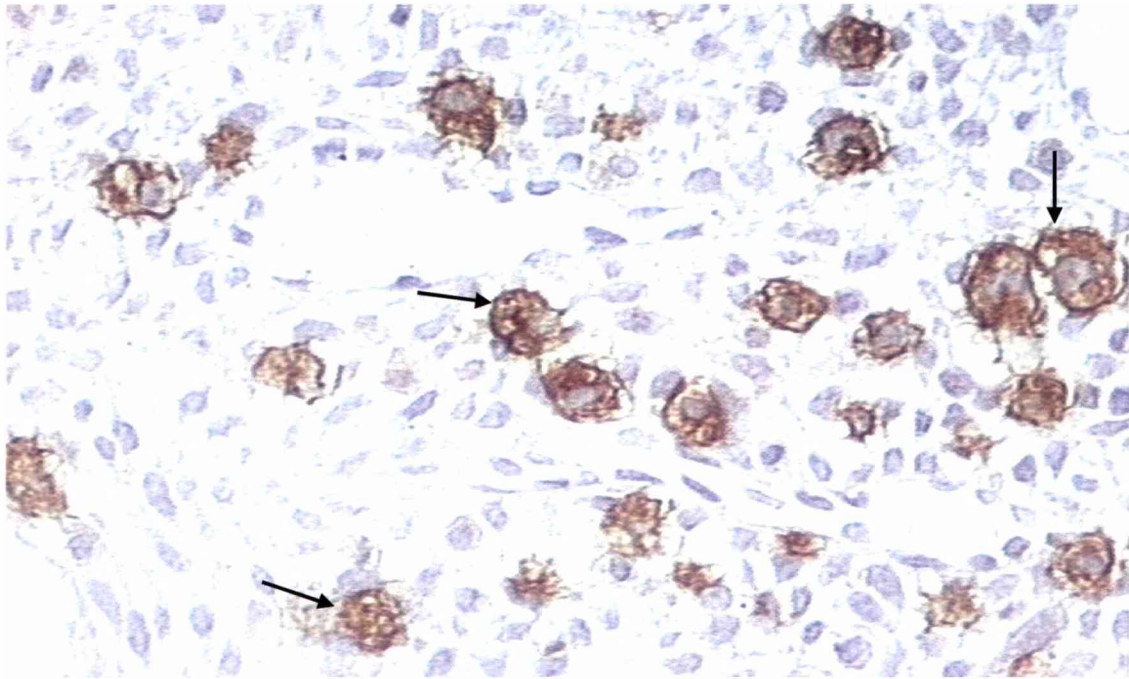


Fig. 20. Las flechas señalan células NK uterinas (GMG) positivas a la marcación con la lectina DBA en la decidua de una hembra BALb/C control. Lectina DBA Hematoxilina. 400X.

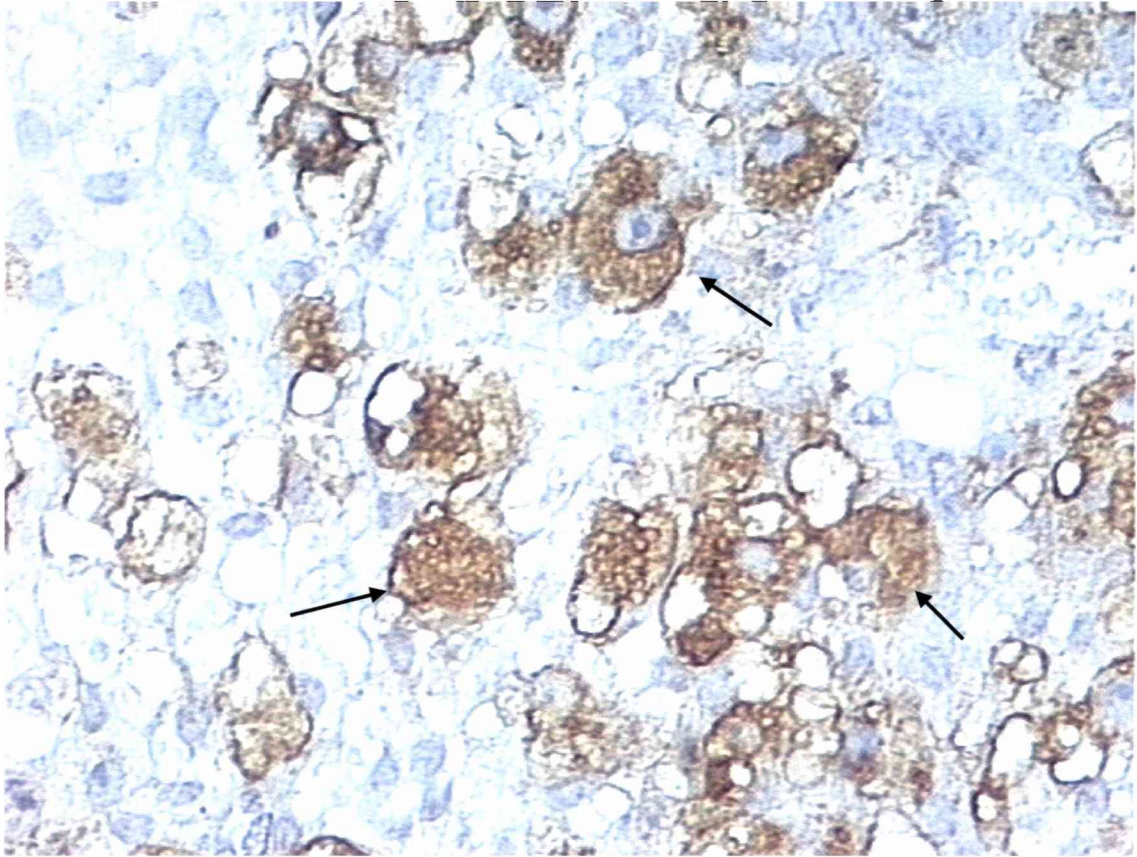


Fig. 21. Las flechas señalan células NK uterinas (GMG) positivas a la marcación con la lectina DBA en la decidua de una hembra infectada. Lectina DBA Hematoxilina. 400X

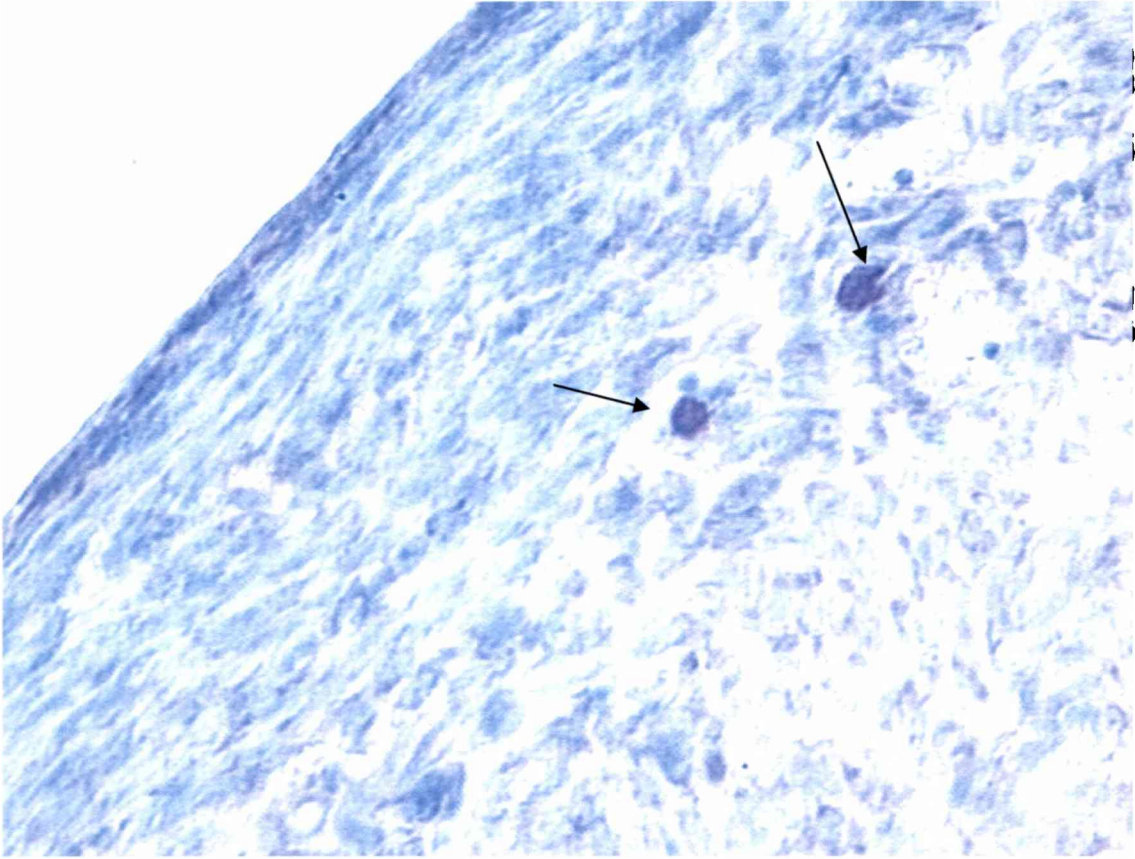


Fig. 22. Mastocitos con coloración metacrómica (flechas) en el miometrio de una hembra control. Azul de toluidina 400X.

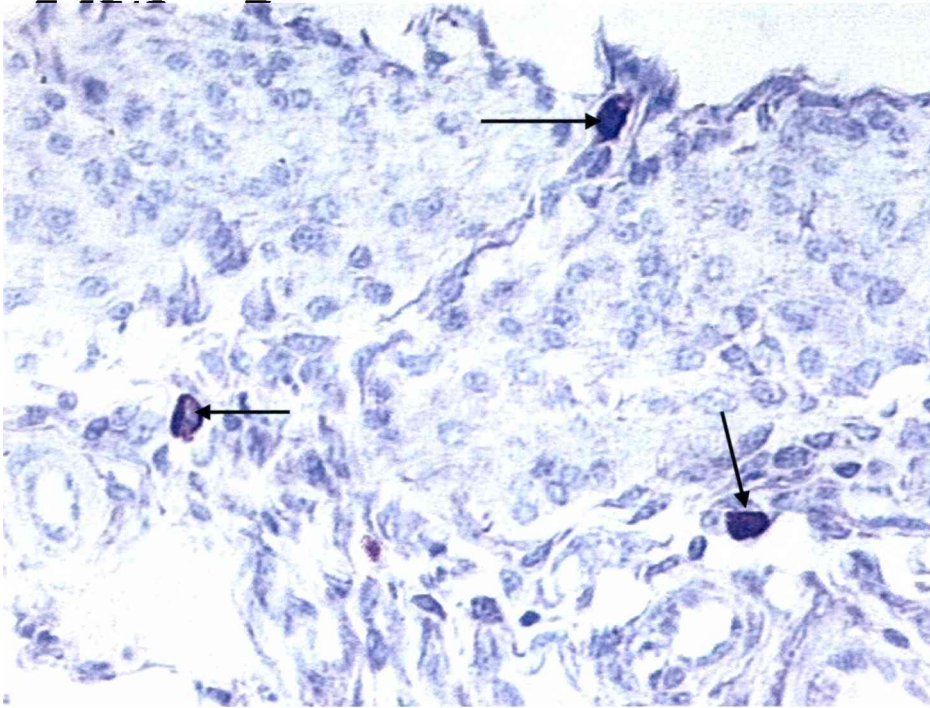


Fig. 23 Mastocitos con coloración metacrómica (flechas) en el miometrio de una hembra BALB/C infectada. Azul de toluidina 400X.

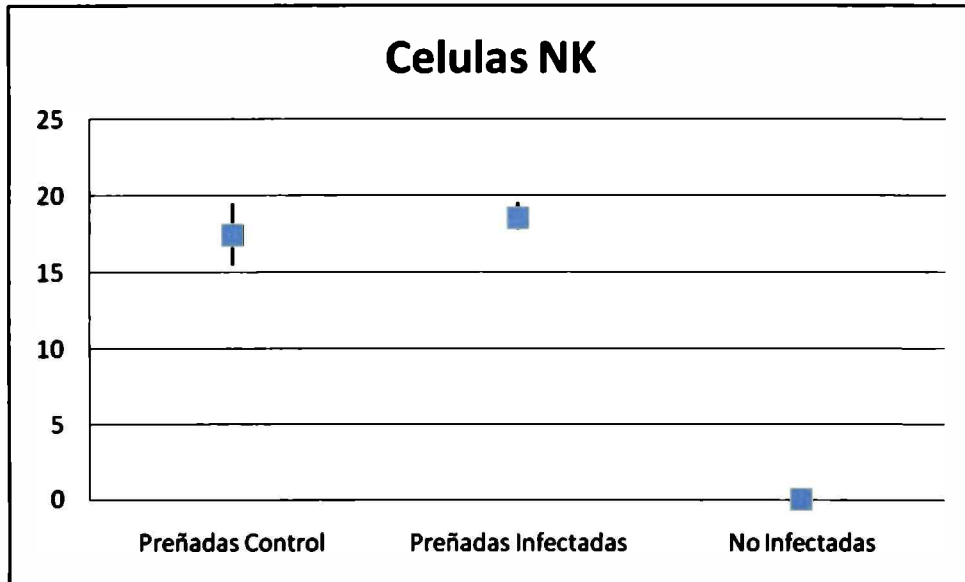


Gráfico 1. Número de células NK uterinas por campo.

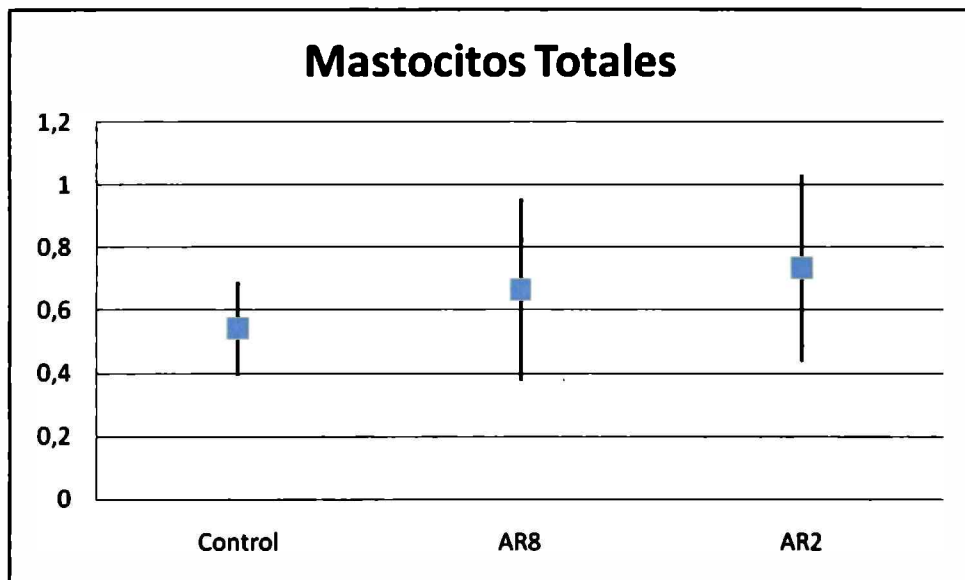


Gráfico 2. Mastocitos por campo microscópico considerando la totalidad de las capas estudiadas.

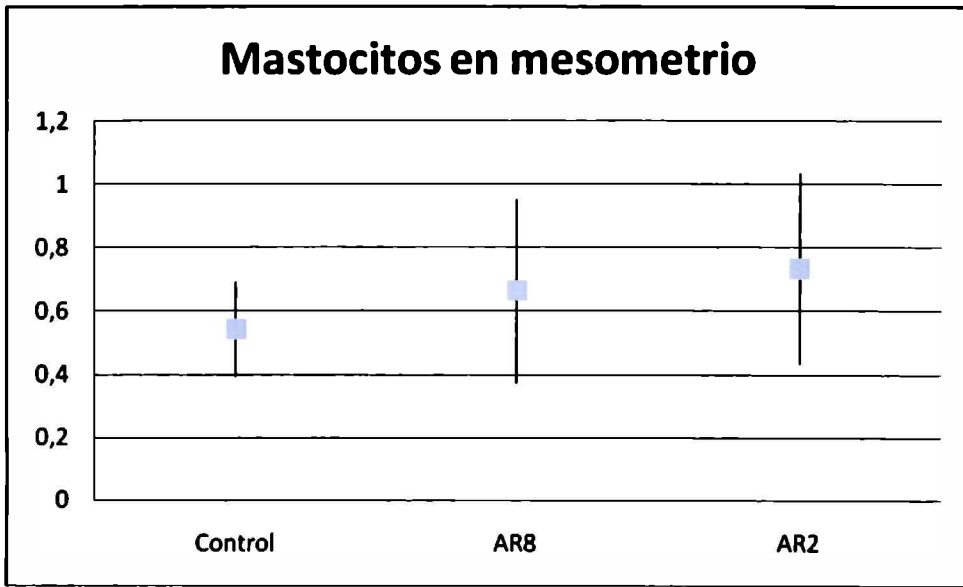


Gráfico 3. Mastocitos por campo microscópico en mesometrio

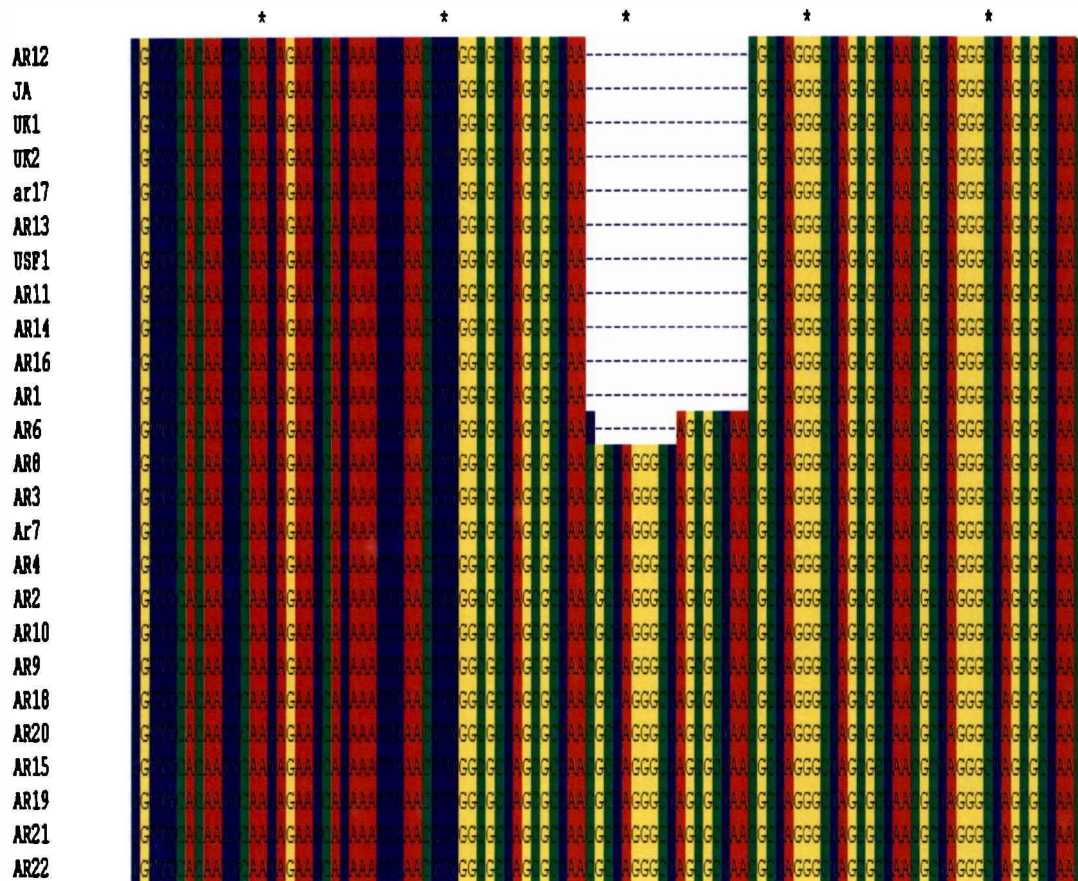


Fig. 24. Alineamiento de las 25 secuencias de EHV-1 correspondientes al sector genómico comprendido entre las posiciones 108803 y 109168. Las deleciones aparecen marcadas con (-).

Fig. 25. Alineamiento de 25 secuencias pertenecientes a cepas de EHV-1 aisladas de diferentes puntos geográficos del mundo.

AR12	TCTAGCCTTG	TTGCTTTGAC	GAGCTTGGTA	GTTACTATCC	ATGCTAGCAT
ATAGACCAGT					
JA	TCTAGCCTTG	TTGCTTTGAC	GAGCTTGGTA	GTTACTATCC	ATGCTAGCAT
ATAGACCAGT					
UK1	TCTAGCCTTG	TTGCTTTGAC	GAGCTTGGTA	GTTACTATCC	ATGCTAGCAT
ATAGACCAGT					
UK2	TCTAGCCTTG	TTGCTTTGAC	GAGCTTGGTA	GTTACTATCC	ATGCTAGCAT
ATAGACCAGT					
AR17	TCTAGCCTTG	TTGCTTTGAC	GAGCTTGGTA	GTTACTATCC	ATGCTAGCAT
ATAGACCAGT					
AR13	TCTAGCCTTG	TTGCTTTGAC	GAGCTTGGTA	GTTACTATCC	ATGCTAGCAT
ATAGACCAGT					
US	TCTAGCCTTG	TTGCTTTGAC	GAGCTTGGTA	GTTACTATCC	ATGCTAGCAT
ATAGACCAGT					
AR11	TCTAGCCTTG	TTGCTTTGAC	GAGCTTGGTA	GTTNCTATCC	ATGCTAGCAT
ATAGACCAGT					
AR14	TCTAGCCTTG	TTGCTTTGAC	GAGCTTGGTA	GTTACTATCC	ATGCTAGCAT
ATAGACCAGT					
AR16	TCTAGCCTTG	TTGCTTTGAC	GAGCTTGGTA	GTTACTATCC	ATGCTAGCAT
ATAGACCAGT					
AR	TCTAGCCTTG	TTGCTTTGAC	GAGCTTGGTA	GTTACTATCC	ATGCTAGCAT
ATAGACCAGT					
AR6	TCTAGCCTTG	TTGCTTTGAC	GAGCTTGGTA	GTTACTATCC	ATGCTAGCAT
ATAGACCAGT					
AR8	TCTAGCCTTG	TTGCTTTGAC	GAGCTTGGTA	GTTACTATCC	ATGCTAGCAT
ATAGACCAGT					
AR3	TCTAGCCTTG	TTGCTTTGAC	GAGCTTGGTA	GTTACTATCC	ATGCTAGCAT
ATAGACCAGT					
AR7	TCTAGCCTTG	TTGCTTTGAC	GAGCTTGGTA	GTTACTATCC	ATGCTAGCAT
ATAGACCAGT					
AR4	TCTAGCCTTG	TTGCTTTGAC	GAGCTTGGTA	GTTACTATCC	ATGCTAGCAT
ATAGACCAGT					
AR2	TCTAGCCTTG	TTGCTTTGAC	GAGCTTGGTA	GTTACTATCC	ATGCTAGCAT
ATAGACCAGT					
AR10	TCTAGCCTTG	TTGCTTTGAC	GAGCTTGGTA	GTTACTATCC	ATGCTAGCAT
ATAGACCAGT					
AR9	TCTAGCCTTG	TTGCTTTGAC	GAGCTTGGTA	GTTACTATCC	ATGCTAGCAT
ATAGACCAGT					
AR18	TCTAGCCTTG	TTGCTTTGAC	GAGCTTGGTA	GTTACTATCC	ATGCTAGCAT
ATAGACCAGT					
AR20	TCTAGCCTTG	TTGCTTTGAC	GAGCTTGGTA	GTTACTATCC	ATGCTAGCAT
ATAGACCAGT					
AR15	TCTAGCCTTG	TTGCTTTGAC	GAGCTTGGTA	GTTACTATCC	ATGCTAGCAT
ATAGACCAGT					
AR19	TCTAGCCTTG	TTGCTTTGAC	GAGCTTGGTA	GTTACTATCC	ATGCTAGCAT
ATAGACCAGT					
AR21	TCTAGCCTTG	TTGCTTTGAC	GAGCTTGGTA	GTTACTATCC	ATGCTAGCAT
ATAGACCAGT					
AR22	TCTAGCCTTG	TTGCTTTGAC	GAGCTTGGTA	GTTACTATCC	ATGCTAGCAT
ATAGACCAGT					

	65	75	85	95	105
115					
AR12	TCGAGCCTAG	CCCAGCAGCG	CATAAACCGC	CTCATTCTTT	CGGGAGTCAC
GAAACTAAGT					
JA	TCGAGCCTAG	CCCAGCAGCG	CATAAACCGC	CTCATTCTTT	CGGGAGTCAC
GAAACTAAGT					
UK1	TCGAGCCTAG	CCCAGCAGCG	CATAAACCGC	CTCATTCTTT	CGGGAGTCAC
GAAACTAAGT					
UK2	TCGAGCCTAG	CCCAGCAGCG	CATAAACCGC	CTCATTCTTT	CGGGAGTCAC
GAAACTAAGT					
AR17	TCGAGCCTAG	CCCAGCAGCG	CATAAACCGC	CTCATTCTTT	CGGGAGTCAC
GAAACTAAGT					
AR13	TCGAGCCTAG	CCCAGCAGCG	CATAAACCGC	CTCATTCTTT	CGGGAGTCAC
GAAACTAAGT					
US	TCGAGCCTAG	CCCAGCAGCG	CATAAACCGC	CTCATTCTTT	CGGGAGTCAC
GAAACTAAGT					
AR11	TCGAGCCTAG	CCCAGCAGCG	CATAAACCGC	CTCATTCTTT	CGGGAGTCAC
GAAACTAAGT					
AR14	TCGAGCCTAG	CCCAGCAGCG	CATAAACCGC	CTCATTCTTT	CGGGAGTCAC
GAAACTAAGT					
AR16	TCGAGCCTAG	CCCAGCAGCG	CATAAACCGC	CTCATTCTTT	CGGGAGTCAC
GAAACTAAGT					
AR1	TCGAGCCTAG	CCCAGCAGCG	CATAAACCGC	CTCATTCTTT	CGGGAGTCAC
GAAACTAAGT					
AR6	TCGAGCCTAG	CCCAGCAGCG	CATAAACCGC	CTCATTCTTT	CGGGAGTCAC
GAAACTAAGT					
AR8	TCGAGCCTAG	CCCAGCAGCG	CATAAACCGC	CTCATTCTTT	CGGGAGTCAC
GAAACTAAGT					
AR3	TCGAGCCTAG	CCCAGCAGCG	CATAAACCGC	CTCATTCTTT	CGGGAGTCAC
GAAACTAAGT					
AR7	TCGAGCCTAG	CCCAGCAGCG	CATAAACCGC	CTCATTCTTT	CGGGAGTCAC
GAAACTAAGT					
AR4	TCGAGCCTAG	CCCAGCAGCG	CATAAACCGC	CTCATTCTTT	CGGGAGTCAC
GAAACTAAGT					
AR2	TCGAGCCTAG	CCCAGCAGCG	CATAAACCGC	CTCATTCTTT	CGGGAGTCAC
GAAACTAAGT					
AR10	TCGAGCCTAG	CCCAGCAGCG	CATAAACCGC	CTCATTCTTT	CGGGAGTCAC
GAAACTAAGT					
AR9	TCGAGCCTAG	CCCAGCAGCG	CATAAACCGC	CTCATTCTTT	CGGGAGTCAC
GAAACTAAGT					
AR18	TCGAGCCTAG	CCCAGCAGCG	CATAAACCGC	CTCATTCTTT	CGGGAGTCAC
GAAACTAAGT					
AR20	TCGAGCCTAG	CCCAGCAGCG	CATAAACCGC	CTCATTCTTT	CGGGAGTCAC
GAAACTAAGT					
AR15	TCGAGCCTAG	CCCAGCAGCG	CATAAACCGC	CTCATTCTTT	CGGGAGTCAC
GAAACTAAGT					
AR19	TCGAGCCTAG	CCCAGCAGCG	CATAAACCGC	CTCATTCTTT	CGGGAGTCAC
GAAACTAAGT					
AR21	TCGAGCCTAG	CCCAGCAGCG	CATAAACCGC	CTCATTCTTT	CGGGAGTCAC
GAAACTAAGT					
AR22	TCGAGCCTAG	CCCAGCAGCG	CATAAACCGC	CTCATTCTTT	CGGGAGTCAC
GAAACTAAGT					
	125	135	145	155	165
175					
AR12	GGCGGTTGGA	ATTCTGTACA	TTGGTTTATG	TACGGGCTTT	TTTGCCAGAC
ACACCCAATT					
JA	GGCGGTTGGA	ATTCTGTACA	TTGGTTTATG	TACGGGCTTT	TTTGCCAGAC
ACACCCAATT					

UK1	GGCGGTTGGA	ATTCTGTACA	TTGGTTTATG	TACGGGCTTT	TTTGCCAGAC
ACACCCAATT					
UK2	GGCGGTTGGA	ATTCTGTACA	TTGGTTTATG	TACGGGCTTT	TTTGCCAGAC
ACACCCAATT					
AR17	GGCGGTTGGA	ATTCTGTACA	TTGGTTTATG	TACGGGCTTT	TTTGCCAGAC
ACACCCAATT					
AR13	GGCGGTTGGA	ATTCTGTACA	TTGGTTTATG	TACGGGCTTT	TTTGCCAGAC
ACACCCAATT					
US	GGCGGTTGGA	ATTCTGTACA	TTGGTTTATG	TACGGGCTTT	TTTGCCAGAC
ACACCCAATT					
AR11	GGCGGTTGGA	ATTCTGTACA	TTGGTTTATG	TACGGGCTTT	TTTGCCAGAC
ACACCCAATT					
AR14	GGCGGTTGGA	ATTCTGTACA	TTGGTTTATG	TACGGGCTTT	TTTGCCAGAC
ACACCCAATT					
AR16	GGCGGTTGGA	ATTCTGTACA	TTGGTTTATG	TACGGGCTTT	TTTGCCAGAC
ACACCCAATT					
AR1	GGCGGTTGGA	ATTCTGTACA	TTGGTTTATG	TACGGGCTTT	TTTGCCAGAC
ACACCCAATT					
AR6	GGCGGTTGGA	ATTCTGTACA	TTGGTTTATG	TACGGGCTTT	TTTGCCAGAC
ACACCCAATT					
AR8	GGCGGTTGGA	ATTCTGTACA	TTGGTTTATG	TACGGGCTTT	TTTGCCAGAC
ACACCCAATT					
AR3	GGCGGTTGGA	ATTCTGTACA	TTGGTTTATG	TACGGGCTTT	TTTGCCAGAC
ACACCCAATT					
AR7	GGCGGTTGGA	ATTCTGTACA	TTGGTTTATG	TACGGGCTTT	TTTGCCAGAC
ACACCCAATT					
AR4	GGCGGTTGGA	ATTCTGTACA	TTGGTTTATG	TACGGGCTTT	TTTGCCAGAC
ACACCCAATT					
AR2	GGCGGTTGGA	ATTCTGTACA	TTGGTTTATG	TACGGGCTTT	TTTGCCAGAC
ACACCCAATT					
AR10	GGCGGTTGGA	ATTCTGTACA	TTGGTTTATG	TACGGGCTTT	TTTGCCAGAC
ACACCCAATT					
AR9	GGCGGTTGGA	ATTCTGTACA	TTGGTTTATG	TACGGGCTTT	TTTGCCAGAC
ACACCCAATT					
AR18	GGCGGTTGGA	ATTCTGTACA	TTGGTTTATG	TACGGGCTTT	TTTGCCAGAC
ACACCCAATT					
AR20	GGCGGTTGGA	ATTCTGTACA	TTGGTTTATG	TACGGGCTTT	TTTGCCAGAC
ACACCCAATT					
AR15	GGCGGTTGGA	ATTCTGTACA	TTGGTTTATG	TACGGGCTTT	TTTGCCAGAC
ACACCCAATT					
AR19	GGCGGTTGGA	ATTCTGTACA	TTGGTTTATG	TACGGGCTTT	TTTGCCAGAC
ACACCCAATT					
AR21	GGCGGTTGGA	ATTCTGTACA	TTGGTTTATG	TACGGGCTTT	TTTGCCAGAC
ACACCCAATT					
AR22	GGCGGTTGGA	ATTCTGTACA	TTGGTTTATG	TACGGGCTTT	TTTGCCAGAC
ACACCCAATT					

185 195 205 215 225

235					
AR12	AGGATTTGAT	ACATCGGGTT	GTTTGCGTTA	ATATAAACAC	ATACAAGTTT
ACGATCAGGT					
JA	AGGATTTGAT	ACATCGGGTT	GTTTGCGTTA	ATATAAACAC	ATACAAGTTT
ACGATCAGGT					
UK1	AGGATTTGAT	ACATCGGGTT	GTTTGCGTTA	ATATAAACAC	ATACAAGTTT
ACGATCAGGT					
UK2	AGGATTTGAT	ACATCGGGTT	GTTTGCGTTA	ATATAAACAC	ATACAAGTTT
ACGATCAGGT					
AR17	AGGATTTGAT	ACATCGGGTT	GTTTGCGTTA	ATATAAACAC	ATACAAGTTT
ACGATCAGGT					
AR13	AGGATTTGAT	ACATCGGGTT	GTTTGCGTTA	ATATAAACAC	ATACAAGTTT
ACGATCAGGT					

US	AGGATTTGAT	ACATCGGGT	GTTTGCCTTA	ATATAAACAC	ATACAAGTTT
ACGATCAGGT					
AR11	AGGATTTGAT	ACATCGGGT	GTTTGCCTTA	ATATAAACAC	ATACAAGTTT
ACGATCAGGT					
AR14	AGGATTTGAT	ACATCGGGT	GTTTGCCTTA	ATATAAACAC	ATACAAGTTT
ACGATCAGGT					
AR16	AGGATTTGAT	ACATCGGGT	GTTTGCCTTA	ATATAAACAC	ATACAAGTTT
ACGATCAGGT					
AR1	AGGATTTGAT	ACATCGGGT	GTTTGCCTTA	ATATAAACAC	ATACAAGTTT
ACGATCAGGT					
AR6	AGGATTTGAT	ACATCGGGT	GTTTGCCTTA	ATATAAACAC	ATACAAGTTT
ACGATCAGGT					
AR8	AGGATTTGAT	ACATCGGGT	GTTTGCCTTA	ATATAAACAC	ATACAAGTTT
ACGATCAGGT					
AR3	AGGATTTGAT	ACATCGGGT	GTTTGCCTTA	ATATAAACAC	ATACAAGTTT
ACGATCAGGT					
AR7	AGGATTTGAT	ACATCGGGT	GTTTGCCTTA	ATATAAACAC	ATACAAGTTT
ACGATCAGGT					
AR4	AGGATTTGAT	ACATCGGGT	GTTTGCCTTA	ATATAAACAC	ATACAAGTTT
ACGATCAGGT					
AR2	AGGATTTGAT	ACATCGGGT	GTTTGCCTTA	ATATAAACAC	ATACAAGTTT
ACGATCAGGT					
AR10	AGGATTTGAT	ACATCGGGT	GTTTGCCTTA	ATATAAACAC	ATACAAGTTT
ACGATCAGGT					
AR9	AGGATTTGAT	ACATCGGGT	GTTTGCCTTA	ATATAAACAC	ATACAAGTTT
ACGATCAGGT					
AR18	AGGATTTGAT	ACATCGGGT	GTTTGCCTTA	ATATAAACAC	ATACAAGTTT
ACGATCAGGT					
AR20	AGGATTTGAT	ACATCGGGT	GTTTGCCTTA	ATATAAACAC	ATACAAGTTT
ACGATCAGGT					
AR15	AGGATTTGAT	ACATCGGGT	GTTTGCCTTA	ATATAAACAC	ATACAAGTTT
ACGATCAGGT					
AR19	AGGATTTGAT	ACATCGGGT	GTTTGCCTTA	ATATAAACAC	ATACAAGTTT
ACGATCAGGT					
AR21	AGGATTTGAT	ACATCGGGT	GTTTGCCTTA	ATATAAACAC	ATACAAGTTT
ACGATCAGGT					
AR22	AGGATTTGAT	ACATCGGGT	GTTTGCCTTA	ATATAAACAC	ATACAAGTTT
ACGATCAGGT					

AR12	TTAGTACCGA	CTCTATATGT	AAAGCGTGTA	TAAAACATG	TTATGAGGGT
CAGAGGTTAG					
JA	TTAGTACCGA	CTCTATATGT	AAAGCGTGTA	TAAAACATG	TTATGAGGGT
CAGAGGTTAG					
UK1	TTAGTACCGA	CTCTATATGT	AAAGCGTGTA	TAAAACATG	TTATGAGGGT
CAGAGGTTAG					
UK2	TTAGTACCGA	CTCTATATGT	AAAGCGTGTA	TAAAACATG	TTATGAGGGT
CAGAGGTTAG					
AR17	TTAGTACCGA	CTCTATATGT	AAAGCGTGTA	TAAAACATG	TTATGAGGGT
CAGAGGTTAG					
AR13	TTAGTACCGA	CTCTATATGT	AAAGCGTGTA	TAAAACATG	TTATGAGGGT
CAGAGGTTAG					
US	TTAGTACCGA	CTCTATATGT	AAAGCGTGTA	TAAAACATG	TTATGAGGGT
CAGAGGTTAG					
AR11	TTAGTACCGA	CTCTATATGT	AAAGCGTGTA	TAAAACATG	TTATGAGGGT
CAGAGGTTAG					
AR14	TTAGTACCGA	CTCTATATGT	AAAGCGTGTA	TAAAACATG	TTATGAGGGT
CAGAGGTTAG					
AR16	TTAGTACCGA	CTCTATATGT	AAAGCGTGTA	TAAAACATG	TTATGAGGGT
CAGAGGTTAG					

AR1	TTAGTACCGA	CTCTATATGT	AAAGCGTGTA	TAAAACATG	TTATGAGGGT
CAGAGGTTAG					
AR6	TTAGTACCGA	CTCTATATGT	AAAGCGTGTA	TAAAACATG	TTATGAGGGT
CAGAGGTTAG					
AR8	TTAGTACCGA	CTCTATATGT	AAAGCGTGTA	TAAAACATG	TTATGAGGGT
CAGAGGTTAG					
AR3	TTAGTACCGA	CTCTATATGT	AAAGCGTGTA	TAAAACATG	TTATGAGGGT
CAGAGGTTAG					
AR7	TTAGTACCGA	CTCTATATGT	AAAGCGTGTA	TAAAACATG	TTATGAGGGT
CAGAGGTTAG					
AR4	TTAGTACCGA	CTCTATATGT	AAAGC-TGTA	TAAAACATG	TTATGAGGGT
CAGAGGTTAG					
AR2	TTAGTACCGA	CTCTATATGT	AAAGCGTGTA	TAAAACATG	TTATGAGGGT
CAGAGGTTAG					
AR10	TTAGTACCGA	CTCTATATGT	AAAGCGTGTA	TAAAACATG	TTATGAGGGT
CAGAGGTTAG					
AR9	TTAGTACCGA	CTCTATATGT	AAAGCGTGTA	TAAAACATG	TTATGAGGGT
CAGAGGTTAG					
AR18	TTAGTACCGA	CTCTATATGT	AAAGCGTGTA	TAAAACATG	TTATGAGGGT
CAGAGGTTAG					
AR20	TTAGTACCGA	CTCTATATGT	AAAGCGTGTA	TAAAACATG	TTATGAGGGT
CAGAGGTTAG					
AR15	TTAGTACCGA	CTCTATATGT	AAAGCGTGTA	TAAAACATG	TTATGAGGGT
CAGAGGTTAG					
AR19	TTAGTACCGA	CTCTATATGT	AAAGCGTGTA	TAAAACATG	TTATGAGGGT
CANAGGTTAG					
AR21	TTAGTACCGA	CTCTATATGT	AAAGCGTGTA	TAAAACATG	TTATGAGGGT
CAGAGGTTAG					
AR22	TTAGTACCGA	CTCTATATGT	AAAGCGTGTA	TAAAACATG	TTATGAGGGT
CAGAGGTTAG					
AR12	ATCCAAGCAA	CCCTTTGTTT	CACAATTCAA	TAGAATCATA	AATTTAACTT
TGGCGCTAGC					
JA	ATCCAAGCAA	CCCTTTGTTT	CACAATTCAA	TAGAATCATA	AATTTAACTT
TGGCGCTAGC					
UK1	ATCCAAGCAA	CCCTTTGTTT	CACAATTCAA	TAGAATCATA	AATTTAACTT
TGGCGCTAGC					
UK2	ATCCAAGCAA	CCCTTTGTTT	CACAATTCAA	TAGAATCATA	AATTTAACTT
TGGCGCTAGC					
AR17	ATCCAAGCAA	CCCTTTGTTT	CACAATTCAA	TAGAATCATA	AATTTAACTT
TGGCGCTAGC					
AR13	ATCCAAGCAA	CCCTTTGTTT	CACAATTCAA	TAGAATCATA	AATTTAACTT
TGGCGCTAGC					
US	ATCCAAGCAA	CCCTTTGTTT	CACAATTCAA	TAGAATCATA	AATTTAACTT
TGGCGCTAGC					
AR11	ATCCAAGCAA	CCCTTTGTTT	CACAATTCAA	TAGAATCATA	AATTTAACTT
TGGCGCTAGC					
AR14	ATCCAAGCAA	CCCTTTGTTT	CACAATTCAA	TAGAATCATA	AATTTAACTT
TGGCGCTAGC					
AR16	ATCCAAGCAA	CCCTTTGTTT	CACAATTCAA	TAGAATCATA	AATTTAACTT
TGGCGCTAGC					
AR1	ATCCAAGCAA	CCCTTTGTTT	CACAATTCAA	TAGAATCATA	AATTTAACTT
TGGCGCTAGC					
AR6	ATCCAAGCAA	CCCTTTGTTT	CACAATTCAA	TAGAATCATA	AATTTAACTT
TGGCGCTAGC					
AR8	ATCCAAGCAA	CCCTTTGTTT	CACAATTCAA	TAGAATCATA	AATTTAACTT
TGGCGCTAGC					
AR3	ATCCAAGCAA	CCCTTTGTTT	CACAATTCAA	TAGAATCATA	AATTTAACTT
TGGCGCTAGC					
AR7	ATCCAAGCAA	CCCTTTGTTT	CACAATTCAA	TAGAATCATA	AATTTAACTT
TGGCGCTAGC					

AR4	ATCCAAG--A	CCCTTTGTTT	CACAATTCAA	TAGAATCATA	AATTTAACTT
TGGCGCTAGC					
AR2	ATCCAAGCAA	CCCTTTGTTT	CACAATTCAA	TAGAATCATA	AATTTAACTT
TGGCGCTAGC					
AR10	ATCCAAGCAA	CCCTTTGTTT	CACAATTCAA	TAGAATCATA	AATTTAACTT
TGGCGCTAGC					
AR9	ATCCAAGCAA	CCCTTTGTTT	CACAATTCAA	TAGAATCATA	AATTTAACTT
TGGCGCTAGC					
AR18	ATCCAAGCAA	CCCTTTGTTT	CACAATTCAA	TAGAATCATA	AATTTAACTT
TGGCGCTAGC					
AR20	ATCCAAGCAA	CCCTTTGTTT	CACAATTCAA	TAGAATCATA	AATTTAACTT
TGGCGCTAGC					
AR15	ATCCAAGCAA	CCCTTTGTTT	CACAATTCAA	TAGAATCATA	AATTTAACTT
TGGCGCTAGC					
AR19	ATCCAAGCAA	CCCTTTGTTT	CACAATTCAA	TAGAATCATA	AATTTAACTT
TGGCGCTAGC					
AR21	ATCCAAGCAA	CCCTTTGTTT	CACAATTCAA	TAGAATCATA	AATTTAACTT
TGGCGCTAGC					
AR22	ATCCAAGCAA	CCCTTTGTTT	CACAATTCAA	TAGAATCATA	AATTTAACTT
TGGCGCTAGC					

	365	375	385	395	405
415					
AR12	GCTAA-----	-----	---CGCTAGG	GCTAGCGCTA	ACGCTAGGGC
TAGCGCTAAC					
JA	GCTAA-----	-----	---CGCTAGG	GCTAGCGCTA	ACGCTAGGGC
TAGCGCTAAC					
UK1	GCTAA-----	-----	---CGCTAGG	GCTAGCGCTA	ACGCTAGGGC
TAGCGCTAAC					
UK2	GCTAA-----	-----	---CGCTAGG	GCTAGCGCTA	ACGCTAGGGC
TAGCGCTAAC					
AR 17	GCTAA-----	-----	---CGCTAGG	GCTAGCGCTA	ACGCTAGGGC
TAGCGCTAAC					
AR13	GCTAA-----	-----	---CGCTAGG	GCTAGCGCTA	ACGCTAGGGC
TAGCGCTAAC					
US	GCTAA-----	-----	---CGCTAGG	GCTAGCGCTA	ACGCTAGGGC
TAGCGCTAAC					
AR11	GCTAA-----	-----	---CGCTAGG	GCTAGCGCTA	ACGCTAGGGC
TAGCGCTAAC					
AR14	GCTAA-----	-----	---CGCTAGG	GCTAGCGCTA	ACGCTAGGGC
TAGCGCTAAC					
AR16	GCTAA-----	-----	---CGCTAGG	GCTAGCGCTA	ACGCTAGGGC
TAGCGCTAAC					
AR1	GCTAA-----	-----	---CGCTAGG	GCTAGCGCTA	ACGCTAGGGC
TAGCGCTAAC					
AR6	GCTAAT-----	-----AGCGC	TAACGCTAGG	GCTAGCGCTA	ACGCTAGGGC
TAGCGCTAAC					
AR8	GCTAACGCTA	GGGCTAGCGC	TAACGCTAGG	GCTAGCGCTA	ACGCTAGGGC
TAGCGCTAAC					
AR3	GCTAACGCTA	GGGCTAGCGC	TAACGCTAGG	GCTAGCGCTA	ACGCTAGGGC
TAGCGCTAAC					
AR7	GCTAACGCTA	GGGCTAGCGC	TAACGCTAGG	GCTAGCGCTA	ACGCTAGGGC
TAGCGCTAAC					
AR4	GCTAACGCTA	GGGCTAGCGC	TAACGCTAGG	GCTAGCGCTA	ACGCTAGGGC
TAGCGCTAAC					
AR2	GCTAACGCTA	GGGCTAGCGC	TAACGCTAGG	GCTAGCGCTA	ACGCTAGGGC
TAGCGCTAAC					
AR10	GCTAACGCTA	GGGCTAGCGC	TAACGCTAGG	GCTAGCGCTA	ACGCTAGGGC
TAGCGCTAAC					
AR9	GCTAACGCTA	GGGCTAGCGC	TAACGCTAGG	GCTAGCGCTA	ACGCTAGGGC
TAGCGCTAAC					

AR18	GCTAACGCTA	GGGCTAGCGC	TAACGCTAGG	GCTAGCGCTA	ACGCTAGGGC
TAGCGCTAAC					
AR20	GCTAACGCTA	GGGCTAGCGC	TAACGCTAGG	GCTAGCGCTA	ACGCTAGGGC
TAGCGCTAAC					
AR15	GCTAACGCTA	GGGCTAGCGC	TAACGCTAGG	GCTAGCGCTA	ACGCTAGGGC
TAGCGCTAAC					
AR19	GCTAACGCTA	GGGCTAGCGC	TAACGCTAGG	GCTAGCGCTA	ACGCTAGGGC
TAGCGCTAAC					
AR21	GCTAACGCTA	GGGCTAGCGC	TAACGCTAGG	GCTAGCGCTA	ACGCTAGGGC
TAGCGCTAAC					
AR22	GCTAACGCTA	GGGCTAGCGC	TAACGCTAGG	GCTAGCGCTA	ACGCTAGGGC
TAGCGCTAAC					

	425	435	445	455	465
475					
AR12	GCTAGGGGCTA	GCACTGGCAG	GCAGCCATTT	TCCAACCTTGT	GCATATGCAA
CGCCCAGGAA					
JA	GCTAGGGGCTA	GCACTGG-AG	GCAGCCATTT	TCCAACCTTGT	GCATATGCAA
CGCCCAGGAA					
UK1	GCTAGGGGCTA	GCACTGG-AG	GCAGCCATTT	TCCAACCTTGT	GCATATGCAA
CGCCCAGGAA					
UK2	GCTAGGGGCTA	GCACTGG-AG	GCAGCCATTT	TCCAACCTTGT	GCATATGCAA
CGCCCAAGAA					
AR 17	GCTAGGGGCTA	GCACTGG-AG	GCAGCCATTT	TCCAACCTTGT	GCATATGCAA
CGCCCAGGAA					
AR13	GCTAGGGGCTA	GCACTGG-AG	GCAGCCATTT	TCCAACCTTGT	GCATATGCAA
CGCCCAGGAA					
US	GCTAGGGGCTA	GCACTGG-AG	GCAGCCATTT	TCCAACCTTGT	GCATATGCAA
CGCCCAGGAA					
AR11	GCTAGGGGCTA	GCACTGG-AG	GCAGCCATTT	TCCAACCTTGT	GCATATGCAA
CGCCCAGGAA					
AR14	GCTAGGGGCTA	GCACTGG-AG	GCAGCCATTT	TCCAACCTTGT	GCATATGCAA
CGCCCAGGAA					
AR16	GCTAGGGGCTA	GCACTGG-AG	GCAGCCATTT	TCCAACCTTGT	GCATATGCAA
CGCCCAGGAA					
AR1	GCTAGGGGCTA	GCACTGG-AG	GCAGCCATTT	TCCAACCTTGT	GCATATGCAA
CGCCCAGGAA					
AR6	GCTAGGGGCTA	GCACTGGCAG	GCAGCCATTT	TCCAACCTTGT	GCATATGCAA
CGCCCAGGAA					
AR8	GCTAGGGGCTA	GCACTGG-AG	GCAGCCATTT	TCCAACCTTGT	GCATATGCAA
CGCCCAGGAA					
AR3	GCTAGGGGCTA	GCACTGG-AG	GCAGCCATTT	TCCAACCTTGT	GCATATGCAA
CGCCCAGGAA					
AR7	GCTAGGGGCTA	GCACTGC-AG	GCAGCCATTT	TCCAACCTTGT	GCATATGCAA
CGCCCAGGAA					
AR4	GCTAGGGGCTA	GCACTGG-AG	GCAGCCATTT	TCCAACCTTGT	GCATATGCAA
CGCCCAGGAA					
AR2	GCTAGGGGCTA	GCACTGG-AG	GCAGCCATTT	TCCAACCTTGT	GCATATGCAA
CGCCCAGGAA					
AR10	GCTAGGGGCTA	GCACTGGCAG	GCAGCCATTT	TCCAACCTTGT	GCATATGCAA
CGCCCAGGAA					
AR9	GCTAGGGGCTA	GCACTGG-AG	GCAGCCATTT	TCCAACCTTGT	GCATATGCAA
CGCCCAGGAA					
AR18	GCTAGGGGCTA	GCACTGG-AG	GCAGCCATTT	TCCAACCTTGT	GCATATGCAA
CGCCCAGGAA					
AR20	GCTAGGGGCTA	GCACTGG-AG	GCAGCCATTT	TCCAACCTTGT	GCATATGCAA
CGCCCAGGAA					
AR15	GCTAGGGGCTA	GCACTGG-AG	GCAGCCATTT	TCCAACCTTGT	GCATATGCAA
CGCCCAGGAA					

AR19	GCTAGGGCTA	GCACTGG-AG	GCAGCCATTT	TCCAAC TTGT	GCATATGCAA
CGCC CAGGAA					
AR21	GCTAGGGCTA	GCACTGG-AG	GCAGCCATTT	TCCAAC TTGT	GCATATGCAA
CGCC CAGGAA					
AR22	GCTAGGGCTA	GCACTGG-AG	GCAGCCATTT	TCCAAC TTGT	GCATATGCAA
CGCC CAGGAA					

	485	495	505	515	525
535					
AR12	GCTGTAATAT	TCCCACCAGG	AAGCGGTCAT	ATGCC CAGGA	CGAGCAAGGC
TGCGGGGGGC					
JA	GCTGTAATAT	TCCCACCAGG	AAGCGGTCAT	ATGCC CAGGA	CGAGCAAGGC
TGCGGGGGGC					
UK1	GCTGTAATAT	TCCCACCAGG	AAGCGGTCAT	ATGCC CAGGA	CGAGCAAGGC
TGCGGGGGGC					
UK2	GCTGTAATAT	TCCCACCAGG	AAGCGGTCAT	ATGCC CAGGA	CGAGCAAGGC
TGCGGGGGGC					
AR17	GCTGTAATAT	TCCCACCAGG	AAGCGGTCAT	ATGCC CAGGA	CGAGCAAGGC
TGCGGGGGGC					
AR13	GCTGTAATAT	TCCCACCAGG	AAGCGGTCAT	ATGCC CAGGA	CGAGCAAGGC
TGCGGGGGGC					
US	GCTGTAATAT	TCCCACCAGG	AAGCGGTCAT	ATGCC CAGGA	CGAGCAAGGC
TGCGGGGGGC					
AR11	GCTGTAATAT	TCCCACCAGG	AAGCGGTCAT	ATGCC CAGGA	CGAGCAAGGC
TGCGGGGGGC					
AR14	GCTGTAATAT	TCCCACCAGG	AAGCGGTCAT	ATGCC CAGGA	CGAGCAAGGC
TGCGGGGGGC					
AR16	GCTGTAATAT	TCCCACCAGG	AAGCGGTCAT	ATGCC CAGGA	CGAGCAAGGC
TGCGGGGGGC					
AR1	GCTGTAATAT	TCCCACCAGG	AAGCGGTCAT	ATGCC CAGGA	CGAGCAAGGC
TGCGGGGGGC					
AR6	GCTGTAATAT	TCCCACCAGG	AAGCGGTCAT	ATGCC CAGGA	CGAGCAAGGC
TGCGGGGGGC					
AR8	GCTGTAATAT	TCCCACCAGG	AAGCGGTCAT	ATGCC CAGGA	CGAGCAAGGC
TGCGGGGGGC					
AR3	GCTGTAATAT	TCCCACCAGG	AAGCGGTCAT	ATGCC CAGGA	CGAGCAAGGC
TGCGGGGGGC					
AR7	GCTGTAATAT	TCCCACCAGG	AAGCGGTCAT	ATGCC CAGGA	CGAGCAAGGC
TGCGGGGGGC					
AR4	GCTGTAATAT	TCCCACCAGG	AAGCGGTCAT	ATGCC CAGGA	CGAGCAAGGC
TGCGGGGGGC					
AR2	GCTGTAATAT	TCCCACCAGG	AAGCGGTCAT	ATGCC CAGGA	CGAGCAAGGC
TGCGGGGGGC					
AR10	GCTGTAATAT	TCCCACCAGG	AAGCGGTCAT	ATGCC CAGGA	CGAGCAAGGC
TGCGGGGGGC					
AR9	GCTGTAATAT	TCCCACCAGG	AAGCGGTCAT	ATGCC CAGGA	CGAGCAAGGC
TGCGGGGGGC					
AR18	GCTGTAATAT	TCCCACCAGG	AAGCGGTCAT	ATGCC CAGGA	CGAGCAAGGC
TGCGGGGGGC					
AR20	GCTGTAATAT	TCCCACCAGG	AAGCGGTCAT	ATGCC CAGGA	CGAGCAAGGC
TGCGGGGGGC					
AR15	GCTGTAATAT	TCCCACCAGG	AAGCGGTCAT	ATGCC CAGGA	CGAGCAAGGC
TGCGGGGGGC					
AR19	GCTGTAATAT	TCCCACCAGG	AAGCGGTCAT	ATGCC CAGGA	CGAGCAAGGC
TGCGGGGGGC					
AR21	GCTGTAATAT	TCCCACCAGG	AAGCGGTCAT	ATGCC CAGGA	CGAGCAAGGC
TGCGGGGGGC					
AR22	GCTGTAATAT	TCCCACCAGG	AAGCGGTCAT	ATGCC CAGGA	CGAGCAAGGC
TGCGGGGGGC					

	545	555	565	575	585
595					
AR12	TTCGATCTAG	AGGAGGAGGT	CTTTTGGCAG	CGGACCGCGG	ATAGGTAAAA
GGTAAGACCT					
JA	TTCGATCTAG	AGGAGGAGGT	CTTTTGGCAG	CGGACCGCGG	ATAGGTAAAA
GGTAAGACCT					
UK1	TTCGATCTAG	AGGAGGAGGT	CTTTTGGCAG	CGGACCGCGG	ATAGGTAAAA
GGTAAGACCT					
UK2	TTCGATCTAG	AGGAGGAGGT	CTTTTGGCAG	CGGACCGCGG	ATAGGTAAAGA
GGTAAGACCT					
AR17	TTCGATCTAG	AGGAGGAGGT	CTTTTGGCAG	CGGACCGCGG	ATAGGTAAAA
GGTAAGACCT					
AR13	TTCGATCTAG	AGGAGGAGGT	CTTTTGGCAG	CGGACCGCGG	ATAGGTAAAA
GGTAAGACCT					
US	TTCGATCTAG	AGGAGGAGGT	CTTTTGGCAG	CGGACCGCGG	ATAGGTAAAA
GGTAAGACCT					
AR11	TTCGATCTAG	AGGAGGAGGT	CTTTTGGCAG	CGGACCGCGG	ATAGGTAAAA
GGTAAGACCT					
AR14	TTCGATCTAG	AGGAGGAGGT	CTTTTGGCAG	CGGACCGCGG	ATAGGTAAAA
GGTAAGACCT					
AR16	TTCGATCTAG	AGGAGGAGGT	CTTTTGGCAG	CGGACCGCGG	ATAGGTAAAA
GGTAAGACCT					
AR1	TTCGATCTAG	AGGAGGAGGT	CTTTTGGCAG	CGGACCGCGG	ATAGGTAAAA
GGTAAGACCT					
AR6	TTCGATCTAG	AGGAGGAGGT	CTTTTGGCAG	CGGACCGCGG	ATAGGTAAAA
GGTAAGACCT					
AR8	TTCGATCTAG	AGGAGGAGGT	CTTTTGGCAG	CGGACCGCGG	ATAGGTAAAA
GGTAAGACCT					
AR3	TTCGATCTAG	AGGAGGAGGT	CTTTTGGCAG	CGGACCGCGG	ATAGGTAAAA
GGTAAGACCT					
AR7	TTCGATCTAG	AGGAGGAGGT	CTTTTGGCAG	CGGACCGCGG	ATAGGTAAAA
GGTAAGACCT					
AR4	TTCGATCTAG	AGGAGGAGGT	CTTTTGGCAG	CGGACCGCGG	ATAGGTAAAA
GGTAAGACCT					
AR2	TTCGATCTAG	AGGAGGAGGT	CTTTTGGCAG	CGGACCGCGG	ATAGGTAAAA
GGTAAGACCT					
AR10	TTCGATCTAG	AGGAGGAGGT	CTTTTGGCAG	CGGACCGCGG	ATAGGTAAAA
GGTAAGACCT					
AR9	TTCGATCTAG	AGGAGGAGGT	CTTTTGGCAG	CGGACCGCGG	ATAGGTAAAA
GGTAAGACCT					
AR18	TTCGATCTAG	AGGAGGAGGT	CTTTTGGCAG	CGGACCGCGG	ATAGGTAAAA
GGTAAGACCT					
AR20	TTCGATCTAG	AGGAGGAGGT	CTTTTGGCAG	CGGACCGCGG	ATAGGTAAAA
GGTAAGACCT					
AR15	TTCGATCTAG	AGGAGGAGGT	CTTTTGGCAG	CGGACCGCGG	ATAGGTAAAA
GGTAAGACCT					
AR19	TTCGATCTAG	AGGAGGAGGT	CTTTTGGCAG	CGGACCGCGG	ATAGGTAAAA
GGTAAGACCT					
AR21	TTCGATCTAG	AGGAGGAGGT	CTTTTGGCAG	CGGACCGCGG	ATAGGTAAAA
GGTAAGACCT					
AR22	TTCGATCTAG	AGGAGGAGGT	CTTTTGGCAG	CGGACCGCGG	ATAGGTAAAA
GGTAAGACCT					
	605	615	625	635	645
655					
AR12	TTCAATGGTA	GATACACCAT	TAGACCGCGC	GGGGGGCAGT	CGTCCAAGGG
GGGCTTGCAG					
JA	TTCAATGGTA	GATACACCAT	TAGACCGCGC	GGGGGGCAGT	CGTCCAAGGG
GGGCTTGCAG					

UK1	TTCAATGGTA	GATACACCAT	TAGACCGCGC	GGGGGGCAGT	CGTCCAAGGG
GGGCTTGCAG					
UK2	TTCAATGGTA	GATACACCAT	TAGACCGCGC	GGGGGGCAGT	CGTCCAAGGG
GAGCTTGCAG					
AR17	TTCAATGGTA	GATACACCAT	TAGACCGCGC	GGGGGGCAGT	CGTCCAAGGG
GGGCTTGCAG					
AR13	TTCAATGGTA	GATACACCAT	TAGACCGCGC	GGGGGGCAGT	CGTCCAAGGG
GGGCTTGCAG					
US	TTCAATGGTA	GATACACCAT	TAGACCGCGC	GGGGGGCAGT	CGTCCAAGGG
GGGCTTGCAG					
AR11	TTCAATGGTA	GATACACCAT	TAGACCGCGC	GGGGGGCAGT	CGTCCAAGGG
GGGCTTGCAG					
AR14	TTCAATGGTA	GATACACCAT	TAGACCGCGC	GGGGGGCAGT	CGTCCAAGGG
GGGCTTGCAG					
AR16	TTCAATGGTA	GATACACCAT	TAGACCGCGC	GGGGGGCAGT	CGTCCAAGGG
GGGCTTGCAG					
AR1	TTCAATGGTA	GATACACCAT	TAGACCGCGC	GGGGGGCAGT	CGTCCAAGGG
GGGCTTGCAG					
AR6	TTCAATGGTA	GATACACCAT	TAGACCGCGC	GGGGGGCAGT	CGTCCAAGGG
GGGCTTGCAG					
AR8	TTCAATGGTA	GATACACCAT	TAGACCGCGC	GGGGGGCAGT	CGTCCAAGGG
GGGCTTGCAG					
AR3	TTCAATGGTA	GATACACCAT	TAGACCGCGC	GGGGG-CAGT	CGTCCAAGGG
GGGCTTGCAG					
AR7	TTCAATGGTA	GATACACCAT	TAGACCGCGC	GGGGGGCAGT	CGTCCAAGGG
GGGCTTGCAG					
AR4	TTCAATGGTA	GATACACCAT	TAGACCGCGC	GGGGGGCAGT	CGTCCAAGGG
GGGCTTGCAG					
AR2	TTCAATGGTA	GATACACCAT	TAGACCGCGC	GGGGGGCAGT	CGTCCAAGGG
GGGCTTGCAG					
AR10	TTCAATGGTA	GATACACCAT	TAGACCGCGC	GGGGGGCAGT	CGTCCAAGGG
GGGCTTGCAG					
AR9	TTCAATGGTA	GATACACCAT	TAGACCGCGC	GGGGGGCAGT	CGTCCAAGGG
GGGCTTGCAG					
AR18	TTCAATGGTA	GATACACCAT	TAGACCGCGC	GGGGGGCAGT	CGTCCAAGGG
GGGCTTGCAG					
AR20	TTCAATGGTA	GATACACCAT	TAGACCGCGC	GGGGGGCAGT	CGTCCAAGGG
GGGCTTGCAG					
AR15	TTCAATGGTA	GATACACCAT	TAGACCGCGC	GGGGGGCAGT	CGTCCAAGGG
GGGCTTGCAG					
AR19	TTCAATGGTA	GATACACCAT	TAGACCGCGC	GGGGGGCAGT	CGTCCAAGGG
GGGCTTGCAG					
AR21	TTCAATGGTA	GATACACCAT	TAGACCGCGC	GGGGGGCAGT	CGTCCAAGGG
GGGCTTGCAG					
AR22	TTCAATGGTA	GATACACCAT	TAGACCGCGC	GGGGGGCAGT	CGTCCAAGGG
GGGCTTGCAG					
AR12	TATATTTAAG	TGGGCTCATA	AAAAATGTAT	GCGATCGTTC	CGCAAAGTCA
CTTTGTTTTT					
JA	TATATTTAAG	TGGGCTCATA	AAAAATGTAT	GCGATCGTTC	CGCAAAGTCA
CTTTGTTTTT					
UK1	TATATTTAAG	TGGGCTCATA	AAAAATGTAT	GCGATCGTTC	CGCAAAGTCA
CTTTGTTTTT					
UK2	TATATTTAAG	TGGGCTCATA	AAAAATGTAT	GCGATCGTTC	CGCAAAGTCA
CTTTGTTTTT					
AR17	TATATTTAAG	TGGGCTCATA	AAAAATGTAT	GCGATCGTTC	CGCAAAGTCA
CTTTGTTTTT					
AR13	TATATTTAAG	TGGGCTCATA	AAAAATGTAT	GCGATCGTTC	CGCAAAGTCA
CTTTGTTTTT					

US	TATATTTAAG	TGGGCTCATA	AAAAATGTAT	GCGATCGTTC	CGCAAAGTCA	
CTTTGTTTTT						
AR11	TATATTTAAG	TGGGCTCATA	AAAAATGTAT	GCGATCGTTC	CGCAAAGTCA	
CTTTGTTTTT						
AR14	TATATTTAAG	TGGGCTCATA	AAAAATGTAT	GCGATCGTTC	CGCAAAGTCA	
CTTTGTTTTT						
AR16	TATATTTAAG	TGGGCTCATA	AAAAATGTAT	GCGATCGTTC	CGCAAAGTCA	
CTTTGTTTTT						
AR1	TATATTTAAG	TGGGCTCATA	AAAAATGTAT	GCNATCGTTC	CGCAAAGTCA	
CTTTGTTTTT						
AR6	TATATTTAAG	TGGGCTCATA	AAAAATGTAT	GCGATCGTTC	CGCAAAGTCA	
CTTTGTTTTT						
AR8	TATATTTAAG	TGGGCTCATA	AAAAATGTAT	GCGATCGTTC	CGCAAAGTCA	
CTTTGTTTTT						
AR3	TATATTTAAG	TGGGCTCATA	AAAAATGTAT	GCGATCGTTC	CGCAAAGTCA	
CTTTGTTTTT						
AR7	TATATTTAAG	TGGGCTCATA	AAAAATGTAT	GCGATCGTTC	CGCAAAGTCA	
CTTTGTTTTT						
AR4	TATATTTAAG	TGGGCTCATA	AAAAATGTAT	GCGATCGTTC	CGCAAAGTCA	
CTTTGTTTTT						
AR2	TATATTTAAG	TGGGCTCATA	AAAAATGTAT	GCGATCGTTC	CGCAAAGTCA	
CTTTGTTTTT						
AR10	TATATTTAAG	TGGGCTCATA	AAAAATGTAT	GCGATCGTTC	CGCAAAGTCA	
CTTTGTTTTT						
AR9	TATATTTAAG	TGGGCTCATA	AAAAATGTAT	GCGATCGTTC	CGCAAAGTCA	
CTTTGTTTTT						
AR18	TATATTTAAG	TGGGCTCATA	AAAAATGTAT	GCGATCGTTC	CGCAAAGTCA	
CTTTGTTTTT						
AR20	TATATTTAAG	TGGGCTCATA	AAAAATGTAT	GCGATCGTTC	CGCAAAGTCA	
CTTTGTTTTT						
AR15	TATATTTAAG	TGGGCTCATA	AAAAATGTAT	GCGATCGTTC	CGCAAAGTCA	
CTTTGTTTTT						
AR19	TATATTTAAG	TGGGCTCATA	AAAAATGTAT	GCGATCGTTC	CGCAAAGTCA	
CTTTGTTTTT						
AR21	TATATTTAAG	TGGGCTCATA	AAAAATGTAT	GCGATCGTTC	CGCAAAGTCA	
CTTTGTTTTT						
AR22	TATATTTAAG	TGGGCTCATA	AAAAATGTAT	GCGATCGTTC	CGCAAAGTCA	
CTTTGTTTTT						
AR12	TTGTTTGGTA	GAAAGCCATT	GCATTAGTGC	GGCGTGAAAG	TGTACCCAAT	--
-----TAA						
JA	TTGTTTGGTA	GAAAGCCATT	GCATTAGTGC	GGCGTGAAAG	TGTACCCAAT	--
-----TAA						
UK1	TTGTTTGGTA	GAAAGCCATT	GCATTAGTGC	GGCGTGAAAG	TGTACCCAAT	--
-----TAA						
UK2	TTGTTTGGTA	GAAAGCCATT	GCATTAGTGC	GGCGTGAAAG	TGTACCCAAT	--
-----TAA						
AR17	TTGTTTGGTA	GAAAGCCATT	GCATTAGTGC	GGCGTGAAAG	TGTACCCAAT	--
-----TAA						
AR13	TTGTTTGGTA	GAAAGCCATT	GCATTAGTGC	GGCGTGAAAG	TGTACCCAAT	--
-----TAA						
US	TTGTTTGGTA	GAAAGCCATT	GCATTAGTGC	GGCGTGAAAG	TGTACCCAAT	--
-----TAA						
AR11	TTGTTTGGTA	GAAAGCCATT	GCATTAGTGC	GGCGTGAAAG	TGTACCCTAT	--
-----TAA						
AR14	TTGTTTGGTA	GAAAGCCATT	GCATTAGTGC	GGCGTGAAAG	TGTACCCAAT	--
-----TAA						
AR16	TTGTTTGGTA	GAAAGCCATT	GCATTAGTGC	GGCGTGAAAG	TGTACCCAAT	--
-----TAA						

AR1	TTGTTTGGTA	GAAAGCCATT	GCATTAGTGC	GGCGTGAAAG	TGTTCCCAAT	--
-----TAA						
AR6	TTGTTTGGTA	GAAAGCCATT	GCATTAGTGC	GGCGTGAAAG	TGTACCCAAT	
ACCCAATTAA						
AR8	TTGTTTGGTA	GAAAGCCATT	GCATTAGTGC	GGCGTGAAAG	TGTACCCAAT	--
-----TAA						
AR3	TTGTTTGGTA	NAAAGCCATT	GCATTAGTGC	GGCGTGAAAG	TGTACCCAAT	--
-----TAA						
Ar7	TTGTTTGGTA	GAAAGCCATT	GCATTAGTGC	GGCGTGAAAG	TGTACCCAAT	--
-----TAA						
AR4	TTGTTTGGTA	GAAAGCCATT	GCATTAGTGC	GGCGTGAAAG	TGTACCCAAT	--
-----TAA						
AR2	TTGTTTGGTA	GAAAGCCATT	GCATTAGTGC	GGCGTGAAAG	TGTACCCAAT	--
-----TAA						
AR10	TTGTTTGGTA	GAAAGCCATT	GCATTAGTGC	GGCGTGAAAG	TGTACCCAAT	--
-----TAA						
AR9	TTGTTTGGTA	GAAAGCCATT	GCATTAGTGC	GGCGTGAAAG	TGTACCCAAT	--
-----TAA						
AR18	TTGTTTGGTA	GAAAGCCATT	GCATTAGTGC	GGCGTGAAAG	TGTACCCAAT	--
-----TAA						
AR20	TTGTTTGGTA	GAAAGCCATT	GCATTAGTGC	GGCGTGAAAG	TGTACCCAAT	--
-----TAA						
AR15	TTGTTTGGTA	GAAAGCCATT	GCATTAGTGC	GGCGTGAAAG	TGTACCCAAT	--
-----TAA						
AR19	TTGTTTGGTA	GAAAGCCATT	GCATTAGTGC	GGCGTGAAAG	TGTACCCAAT	--
-----TAA						
AR21	TTGTTTGGTA	GAAAGCCATT	GCATTAGTGC	GGCGTGAAAG	TGTACCCAAT	--
-----TAA						
AR22	TTGTTTGGTA	GAAAGCCATT	GCATTAGTGC	GGCGTGAAAG	TGTACCCAAT	--
-----TAA						

	785	795	805	815	825	
835						
AR12	CAAGATTGGA	GAACAACAAA	-CTGTCGACG	GGACAGGATA	TGCCAAACAT	
CAATTGGTAT						
JA	CAAGATTGGA	GAACAACAAA	-CTGTCGACG	GGACAGGATA	TGCCAAACAT	
CAATTGGTAT						
UK1	CAAGATTGGA	GAACAACAAA	-CTGTCGACG	GGACAGGATA	TGCCAAACAT	
CAATTGGTAT						
UK2	CAAGATTGGA	GAACAACAAA	-CTGTCGACG	GGACAGGATA	TGCCAAACAT	
CAATTGGTGT						
AR17	CAAGATTGGA	GAACAACAAA	-CTGTCGACG	GGACAGGATA	TGCCAAACAT	
CAATTGGTAT						
AR13	CAAGATTGGA	GAACAACAAA	-CTGTCGACG	GGACAGGATA	TGCCAAACAT	
CAATTGGTAT						
US	CAAGATTGGA	GAACAACAAA	-CTGTCGACG	GGACAGGATA	TGCCAAACAT	
CAATTGGTAT						
AR11	CAAGATTGGA	GAACAACAAA	-CTGTCGACG	GGACAGGATA	TGCCAAACAT	
CAATTGGTAT						
AR14	CAAGATTGGA	GAACAACAAA	-CTGTCGACG	GGACAGGATA	TGCCAAACAT	
CAATTGGTAT						
AR16	CAAGATTGGA	GAACAACAAA	-CTGTCGACG	GGACAGGATA	TGCCAAACAT	
CAATTGGTAT						
AR1	CAAGATTGGA	GAACAACAAA	-CTGTCGACG	GGACAGGATA	TGCCAAACAT	
CAATTGGTAT						
AR6	CAAGATTGGA	GAACAACAAA	-CTGTCGACG	GGACAGGATA	TGCCAAACAT	
CAATTGGTAT						
AR8	CAAGATTGGA	GAACAACAAA	-CTGTCGACG	GGACAGGATA	TGCCAAACAT	
CAATTGGTAT						
AR3	CAAGATTGGA	GAACAACAAA	-CTGTCGACG	GGACAGGATA	TGCCAAACAT	
CAATTGGTAT						

AR7 CAAGATTGGA GAACAACAAA -CTGTCGACG GGACAGGATA TGCCAAACAT
CAATTGGTAT
AR4 CAAGATTGGA GAACAACAAA ACTGTCGACG GGACAGGATA TGCCAAACAT
CAATTGGTAT
AR2 CAAGATTGGA GAACAACAAA -CTGTCGACG GGACAGGATA TGCCAAACAT
CAATTGGTAT
AR10 CAAGATTGGA GAACAACAAA -CTGTCGACG GGACAGGATA TGCCAAACAT
CAATTGGTAT
AR9 CAAGATTGGA GAACAACAAA -CTGTCGACG GGACAGGATA TGCCAAACAT
CAATTGGTAT
AR18 CAAGATTGGA GAACAACAAA -CTGTCGACG GGACAGGATA TGCCAAACAT
CAATTGGTAT
AR20 CAAGATTGGA GAACAACAAA -CTGTCGACG GGACAGGATA TGCCAAACAT
CAATTGGTAT
AR15 CAAGATTGGA GAACAACAAA -CTGTCGACG GGACAGGATA TGCCAAACAT
CAATTGGTAT
AR19 CAAGATTGGA GAACAACAAA -CTGTCGACG GGACAGGATA TGCCAAACAT
CAATTGGTAT
AR21 CAAGATTGGA GAACAACAAA -CTGTCGACG GGACAGGATA TGCCAAACAT
CAATTGGTAT
AR22 CAAGATTGGA GAACAACAAA -CTGTCGACG GGACAGGATA TGCCAAACAT
CAATTGGTAT

AR12 ATAGGTATGC ACGCGCTGGA CATTAGGGGG CGCCTTATTA ATACGATGTG
GAAAGCCCAG
JA ATAGGTATGC ACGCGCTGGA CATTAGGGGG CGCCTTATTA ATACGATGTG
GAAAGCCCAG
UK1 ATAGGTATGC ACGCGCTGGA CATTAGGGGG CGCCTTATTA ATACGATGTG
GAAAGCCCAG
UK2 ATAGGTATGC ACGCGCTGGA CATTAGGGGG CGCCTTATTA ATACGATGTG
GAAAGCCCAG
AR17 ATAGGTATGC ACGCGCTGGA CATTAGGGGG CGCCTTATTA ATACGATGTG
GAAAGCCCAG
AR13 ATAGGTATGC ACGCGCTGGA CATTAGGGGG CGCCTTATTA ATACGATGTG
GAAAGCCCAG
US ATAGGTATGC ACGCGCTGGA CATTAGGGGG CGCCTTATTA ATACGATGTG
GAAAGCCCAG
AR11 ATAGGTATGC ACGCGCTGGA CATTAGGGGG CGCCTTATTA ATACGATGTG
GAAAGCCCAG
AR14 ATAGGTATGC ACGCGCTGGA CATTAGGGGG CGCCTTATTA ATACGATGTG
GAAAGCCCAG
AR16 ATAGGTATGC ACGCGCTGGA CATTAGGGGG CGCCTTATTA ATACGATGTG
GAAAGCCCAG
AR1 ATAGGTATGC ACGCGCTGGA CATTAGGGGG CGCCTTATTA ATACGATGTG
GAAAGCCCAG
AR6 ATAGGTATGC ACGCGCTGGA CATTAGGGGG CGCCTTATTA ATACGATGTG
GAAAGCCCAG
AR8 ATAGGTATGC ACGCGCTGGA CATTAGGGGG CGCCTTATTA ATACGATGTG
GAAAGCCCAG
AR3 ATAGGTATGC ACGCGCTGGA CATTAGGGGG CGCCTTATTA ATACGATGTG
GAAAGCCCAG
AR7 ATAGGTATGC ACGCGCTGGA CATTAGGGGG CGCCTTATTA ATACGATGTG
GAAAGCCCAG
AR4 ATAGGTATGC ACGCGCTGGA CATTAGGGGG CGCCTTATTA ATACGATGTG
GAAAGCCCAG
AR2 ATAGGTATGC ACGCGCTGGA CATTAGGGGG CGCCTTATTA ATACGATGTG
GAAAGCCCAG
AR10 ATAGGTATGC ACGCGCTGGA CATTAGGGGG CGCCTTATTA ATACGATGTG
GAAAGCCCAG

AR9	ATAGGTATGC	ACGCGCTGGA	CATTAGGGGG	CGCCTTATTA	ATACGATGTG
GAAAGCCCAG					
AR18	ATAGGTATGC	ACGCGCTGGA	CATTAGGGGG	CGCCTTATTA	ATACGATGTG
GAAAGCCCAG					
AR20	ATAGGTATGC	ACGCGCTGGA	CATTAGGGGG	CGCCTTATTA	ATACGATGTG
GAAAGCCCAG					
AR15	ATAGGTATGC	ACGCGCTGGA	CATTAGGGGG	CGCCTTATTA	ATACGATGTG
GAAAGCCCAG					
AR19F1	ATAGGTATGC	ACGCGCTGGA	CATTAGGGGG	CGCCTTATTA	ATACGATGTG
GAAAGCCCAG					
AR21	ATAGGTATGC	ACGCGCTGGA	CATTAGGGGG	CGCCTTATTA	ATACGATGTG
GAAAGCCCAG					
AR22	ATAGGTATGC	ACGCGCTGGA	CATTAGGGGG	CGCCTTATTA	ATACGATGTG
GAAAGCCCAG					

	905	915	925	935	945
955					
AR12	CTGCAATAGC	ATCAGTAAAC	AGTTTTCCAT	TCTAAAAATA	TCTATGGGAT
TATGCTATGC					
JA	CTGCAATAGC	ATCAGTAAAC	AGTTTTCCAT	TCTAAAAATA	TCTATGGGAT
TATGCTATGC					
UK1	CTGCAATAGC	ATCAGTAAAC	AGTTTTCCAT	TCTAAAAATA	TCTATGGGAT
TATGCTATGC					
UK2	CTGCAATAGC	ATCAGTAAAC	AGTTTTCCAT	TCTAAAAATA	TCTATGGGAT
TATGCTATGC					
AR17	CTGCAATAGC	ATCAGTAAAC	AGTTTTCCAT	TCTAAAAATA	TCTATGGGAT
TATGCTATGC					
AR13	CTGCAATAGC	ATCAGTAAAC	AGTTTTCCAT	TCTAAAAATA	TCTATGGGAT
TATGCTATGC					
US	CTGCAATAGC	ATCAGTAAAC	AGTTTTCCAT	TCTAAAAATA	TCTATGGGAT
TATGCTATGC					
AR11	CTGCAATAGC	ATCAGTAAAC	AGTTTTCCAT	TCTAAAAATA	TCTATGGGAT
TATGCTATGC					
AR14	CTGCAATAGC	ATCAGTAAAC	AGTTTTCCAT	TCTAAAAATA	TCTATGGGAT
TATGCTATGC					
AR16	CTGCAATAGC	ATCAGTAAAC	AGTTTTCCAT	TCTAAAAATA	TCTATGGGAT
TATGCTATGC					
AR1	CTGCAATAGC	ATCAGTAAAC	AGTTTTCCAT	TCTAAAAATA	TCTATGGGAT
TATGCTATGC					
AR6	CTGCAATAGC	ATCAGTAAAC	AGTTTTCCAT	TCTAAAAATA	TCTATGGGAT
TATGCTATGC					
AR8	CTGCAATAGC	ATCAGTAAAC	AGTTTTCCAT	TCTAAAAATA	TCTATGGGAT
TATGCTATGC					
AR3	CTGCAATAGC	ATCAGTAAAC	AGTTTTCCAT	TCTAAAAATA	TCTATGGGAT
TATGCTATGC					
AR7	CTGCAATAGC	ATCAGTAAAC	AGTTTTCCAT	TCTAAAAATA	TCTATGGGAT
TATGCTATGC					
AR4	CTGCAATAGC	ATCAGTAAAC	AGTTTTCCAT	TCTAAAAATA	TCTATGGGAT
TATGCTATGC					
AR2	CTGCAATAGC	ATCAGTAAAC	AGTTTTCCAT	TCTAAAAATA	TCTATGGGAT
TATGCTATGC					
AR10	CTGCAATAGC	ATCAGTAAAC	AGTTTTCCAT	TCTAAAAATA	TCTATGGGAT
TATGCTATGC					
AR9	CTGCAATAGC	ATCAGTAAAC	AGTTTTCCAT	TCTAAAAATA	TCTATGGGAT
TATGCTATGC					
AR18	CTGCAATAGC	ATCAGTAAAC	AGTTTTCCAT	TCTAAAAATA	TCTATGGGAT
TATGCTATGC					
AR20	CTGCAATAGC	ATCAGTAAAC	AGTTTTCCAT	TCTAAAAATA	TCTATGGGAT
TATGCTATGC					

AR15	CTGCAATAGC	ATCAGTAAAC	AGTTTTCCAT	TCTAAAAATA	TCTATGGGAT
TATGCTATGC					
AR19	CTGCAATAGC	ATCAGTAAAC	AGTTTTCCAT	TCTAAAAATA	TCTATGGGAT
TATGCTATGC					
AR21	CTGCAATAGC	ATCAGTAAAC	AGTTTTCCAT	TCTAAAAATA	TCTATGGGAT
TATGCTATGC					
AR22	CTGCAATAGC	ATCAGTAAAC	AGTTTTCCAT	TCTAAAAATA	TCTATGGGAT
TATGCTATGC					

	965	975	985	995	1005
1015					
AR12	ACTGTGGGTT	TAAGATTGGC	AAAAGATCTC	CCCCATGCAA	ATGTTTTAGG
GTAGGCTGTA					
JA	ACTGTGGGTT	TAANATTGGC	AAAAGATCTC	CCCCATGCAA	ATGTTTTAGG
GTAGGCTGTA					
UK1	ACTGTGGGTT	TAAGATTGGC	AAAAGATCTC	CCCCATGCAA	ATGTTTTAGG
GTAGGCTGTA					
UK2	ACTGTGGGTT	TAAGATTGGC	AAAAGATCTC	CCCCATGCAA	ATGTTTTAGG
GTAGGCTGTA					
AR17	ACTGTGGGTT	TAAGATTGGC	AAAAGATCTC	CCCCATGCAA	ATGTTTTAGG
GTAGGCTGTA					
AR13	ACTGTGGGTT	TAAGATTGGC	AAAAGATCTC	CCCCATGCAA	ATGTTTTAGG
GTAGGCTGTA					
US	ACTGTGGGTT	TAANATTGGC	AAAAGATCTC	CCCCATGCAA	ATGTTTTAGG
GTAGGCTGTA					
AR11	ACTGTGGGTT	TAAGATTGGC	AAAAGATCTC	CCCCATGCAA	ATGTTTTAGG
GTAGGCTGTA					
AR14	ACTGTGGGTT	TAAGATTGGC	AAAAGATCTC	CCCCATGCAA	ATGTTTTAGG
GTAGGCTGTA					
AR16	ACTGTGGGTT	TAAGATTGGC	AAAAGATCTC	CCCCATGCAA	ATGTTTTAGG
GTAGGCTGTA					
AR1	ACTGTGGGTT	TAAGATTGGC	AAAAGATCTC	CCCCATGCAA	ATGTTTTAGG
GTAGGCTGTA					
AR6	ACTGTGGGTT	TAANATTGGC	AAAAGATCTC	CCCCATGCAA	ATGTTTTAGG
GTAGGCTGTA					
AR8	ACTGTGGGTT	TAAGATTGGC	AAAAGATCTC	CCCCATGCAA	ATGTTTTAGG
GTAGGCTGTA					
AR3	ACTGTGGGTT	TAAGATTGGC	AAAAGATCTC	CCCCATGCAA	ATGTTTTAGG
GTAGGCTGTA					
AR7	ACTGTGGGTT	TAAGATTGGC	AAAAGATCTC	CCCCATGCAA	ATGTTTTAGG
GTAGGCTGTA					
AR4	ACTGTGGGTT	TAAGATTGGC	AAAAGATCTC	CCCCATGCAA	ATGTTTTAGG
GTAGGCTGTA					
AR2	ACTGTGGGTT	TAAGATTGGC	AAAAGATCTC	CCCCATGCAA	ATGTTTTAGG
GTAGGCTGTA					
AR10	ACTGTGGGTT	TAAGATTGGC	AAAAAATCTC	CCCCATGCAA	ATGTTTTAGG
GTAGGCTGTA					
AR9	ACTGTGGGTT	TAAGATTGGC	AAAAGATCTC	CCCCATGCAA	ATGTTTTAGG
GTAGGCTGTA					
AR18	ACTGTGGGTT	TAAGATTGGC	AAAAGATCTC	CCCCATGCAA	ATGTTTTAGG
GTAGGCTGTA					
AR20	ACTGTGGGTT	TAAGATTGGC	AAAAGATCTC	CCCCATGCAA	ATGTTTTAGG
GTAGGCTGTA					
AR15	ACTGTGGGTT	TAANATTGGC	AAAAGATCTC	CCCCATGCAA	ATGTTTTAGG
GTAGGCTGTA					
AR19	ACTGTGGGTT	TAAGATTGGC	AAAAGATCTC	CCCCATGCAA	ATGTTTTAGG
GTAGGCTGTA					
AR21	ACTGTGGGTT	TAAGATTGGC	AAAAGATCTC	CCCCATGCAA	ATGTTTTAGG
GTAGGCTGTA					

AR22	ACTGTGGGTT	TAAGATTGGC	AAAAGATCTC	CCCCATGCAA	ATGTTTTAGG
GTAGGCTGTA					
	1025	1035	1045	1055	1065
1075					
AR12	CATGGAATAG	GTAAACGCTT	GGGGG-TCTT	CTAACTCGGT	TGCATTAAAG
GGGTCAAGGC					
JA	CATGGAATAG	GTAAACGCTT	GGGGG-TCTT	CTAACTCGGT	TGCATTAAAG
GGGTCAAGGC					
UK1	CATGGAATAG	GTAAACGCTT	GGGGG-TCTT	CTAACTCGGT	TGCATTAAAG
GGGTCAAGGC					
UK2	CATGGAATAG	GTAAACGCTT	GGGGG-TCTT	CTAACTCGGT	TGCATTAAAG
GGGTCAAGGC					
AR17	CATGGAATAG	GTAAACGCTT	GGGGG-TCTT	CTAACTCGGT	TGCATTAAAG
GGGTCAAGGC					
AR13	CATGGAATAG	GTAAACGCTT	GGGGG-TCTT	CTAACTCGGT	TGCATTAAAG
GGGTCAAGGC					
US	CATGGAATAG	GTAAACGCTT	GGGGG-TCTT	CTAACTCGGT	TGCATTAAAG
GGGTCAAGGC					
AR11	CATGGAATAG	GTAAACGCTT	GGGGG-TCTT	CTAACTCGGT	TGCATTAAAG
GGGTCAAGGC					
AR14	CATGGAATAG	GTAAACGCTT	GGGGG-TCTT	CTAACTCGGT	TGCATTAAAG
GGGTCAAGGC					
AR16	CATGGAATAG	GTAAACGCTT	GGGGG-TCTT	CTAACTCGGT	TGCATTAAAG
GGGTCAAGGC					
AR1	CATGGAATAG	GTAAACGCTT	GGGGG-TCTT	CTAACTCGGT	TGCATTAAAG
GGGTCAAGGC					
AR6	CATGGAATAG	GTAAACGCTT	GGGGG-TCTT	CTAACTCGGT	TGCATTAAAG
GGGTCAAGGC					
AR8	CATGGAATAG	GTAAACGCTT	GGGGG-TCTT	CTAACTCGGT	TGCATTAAAG
GGGTCAAGGC					
AR3	CATGGAATAG	GTAAACGCTT	GGGGG-TCTT	CTAACTCGGT	TGCATTAAAG
GGGTCAAGGC					
AR7	CATGGAATAG	GTAAACGCTT	GGGGG-TCTT	CTAACTCGGT	TGCATTAAAG
GGGTCAAGGC					
AR4	CATGGAATAG	GTAAACGCTT	GGGGG-TCTT	CTAACTCGGT	TGCATTAAAG
GGGTCAAGGC					
AR2	CATGGAATAG	GTAAACGCTT	GGGGG-TCTT	CTAACTCGGT	TGCATTAAAG
GGGTCAAGGC					
AR10	CATGGAATAG	GTAAACGCTT	GGGGGGTCTT	CTAACTCGGN	TGCATTAAAG
GGGTCAAGGC					
AR9	CATGGAATAG	GTAAACGCTT	GGGGG-TCTT	CTAACTCGGT	TGCATTAAAG
GGGTCAAGGC					
AR18	CATGGAATAG	GTAAACGCTT	GGGGG-TCTT	CTAACTCGGT	TGCATTAAAG
GGGTCAAGGC					
AR20	CATGGAATAG	GTAAACGCTT	GGGGG-TCTT	CTAACTCGGT	TGCATTAAAG
GGGTCAAGGC					
AR15	CATGGAATAG	GTAAACGCTT	GGGGG-TCTT	CTAACTCGGT	TGCATTAAAG
GGGTCAAGGC					
AR19	CATGGAATAG	GTAAACGCTT	GGGGG-TCTT	CTAACTCGGT	TGCATTAAAG
GGGTCAAGGC					
AR21	CATGGAATAG	GTAAACGCTT	GGGGG-TCTT	CTAACTCGGT	TGCATTAAAG
GGGTCAAGGC					
AR22	CATGGAATAG	GTAAACGCTT	GGGGG-TCTT	CTAACTCGGT	TGCATTAAAG
GGGTCAAGGC					

1085	1095	1105	1115	1125	1135
AR12	TTTGGTTTGG	TTTTAAGGCG	ATTATTACAG	CATCGTGTTT	CAAGGCGCTT
TAAACCCAAA					
JA	TTTGGTTTGG	TTTTAAGGCG	ATTATTACAG	CATCGTGTTT	CAAGGCGCTT
TAAACCCAAA					
UK1	TTTGGTTTGG	TTTTAAGGCG	ATTATTACAG	CATCGTGTTT	CAAGGCGCT-
TAAACCCAAA					
UK2	TTTGGTTTGG	TTTTAAGGCG	ATTATTACAG	CATCGTGTTT	CAAGGCGCT-
TAAACCCAAA					
AR17	TTTGGTTTGG	TTTTAAGGCG	ATTATTACAG	CATCGTGTTT	CAAGGCGCTT
TAAACCCAAA					
AR13	TTTGGTTTGG	TTTTAAGGCG	ATTATTACAG	CATCGTGTTT	CAAGGCGCTT
TAAACCCAAA					
US	TTTGGTTTGG	TTTTAAGGCN	ATTATTACAN	CATCGCGTTT	CAAGGCGCTT
TAAACCCAAA					
AR11	TTTGGTTTGG	TTTTAAGGCG	ATTATTACAG	CATCGTGTTT	CAAGGCGCTT
TAAACCCAAA					
AR14	TTTGGTTTGG	TTTTAAGGCG	ATTATTACAG	CATCGTGTTT	CAAGGCGCTT
TAAACCCAAA					
AR16	TTTGGTTTGG	TTTTAAGGCG	ATTATTACAG	CATCGTGTTT	CAAGGCGCTT
TAAACCCAAA					
AR1	TTTGGTTTGG	TTTTAAGGCG	ATTATTACAG	CATCGTGTTT	CAAGGCGCTT
TAAACCCAAA					
AR6	TTTGGTTTGG	TTTTAAGGCG	ATTATTACAG	CATCGTGTTT	CAAGGCGCTT
TAAACCCAAA					
AR8	TTTGGTTTGG	TTTTAAGGCG	ATTATTACAG	CATCGTGTTT	CAAGGCGCTT
TAAACCCAAA					
AR3	TTTGGTTTGG	TTTTAAGGCG	ATTATTACAG	CATCGTGTTT	CAAGGCGCTT
TAAACCCAAA					
AR7	TTTGGTTTGG	TTTTAAGGCG	ATTATTACAG	CATCGTGTTT	CAAGGCGCTT
TAAACCCAAA					
AR4	TTTGGTTTGG	TTTTAAGGCG	ATTATTACAG	CATCGTGTTT	CAAGGCGCTT
TAAACCCAAA					
AR2	TTTGGTTTGG	TTTTAAGGCG	ATTATTACAG	CATCGTGTTT	CAAGGCGCTT
TAAACCCAAA					
AR10	TTTGGTTTGG	TTT-AAGGCG	ATTATTACAG	CATCGTGTTT	CAAGGCGCTT
TAAACCCAAA					
AR9	TTTGGTTTGG	TTTTAAGGCG	ATTATTACAG	CATCGTGTTT	CAAGGCGCTT
TAAACCCAAA					
AR18	TTTGGTTTGG	TTTTAAGGCG	ATTATTACAG	CATCGTGTTT	CAAGGCGCTT
TAAACCCAAA					
AR20	TTTGGTTTGG	TTTTAAGGCG	ATTATTACAG	CATCGTGTTT	CAAGGCGCTT
TAAACCCAAA					
AR15	TTTGGTTTGG	TTTTAAGGCG	ATTATTACAG	CATCGTGTTT	CAAGGCGCTT
TAAACCCAAA					
AR19	TTTGGTTTGG	TTTTAAGGCG	ATTATTACAG	CATCGTGTTT	CAAGGCGCTT
TAAACCCAAA					
AR21	TTTGGTTTGG	TTTTAAGGCG	ATTATTACAG	CATCGTGTTT	CAAGGCGCTT
TAAACCCAAA					
AR22	TTTGGTTTGG	TTTTAAGGCG	ATTATTACAG	CATCGTGTTT	CAAGGCGCTT
TAAACCCAAA					

		1145	1155	1165	1175
1185	1195				
AR12	GATATCTATT	TTTAAAGCTC	CCCCATTTTCG	CGGTTGCCCC	CACCCACACC
CCGTGCATAG					
JA	GATATCTATT	TTTAAAGCTC	CCCC-TTTCG	CGGTTGCCCC	CACCCACACC
CC-TGCATAG					
UK1	GATATCTATT	TTTAAAGCTC	CCCC-TTTCG	CGGTTGCCCC	CACCCACACC
CC-TGCATAG					

UK2	GATATCTATT	TTTAAAGCTC	CCCC-TTTCG	CGGTTGCCCC	CACCCACACC
CC-TGCATAG					
AR17	GATATCTATT	TTTAAAGCTC	CCCC-TTTCG	CGGTTGCCCC	CACCCACACC
CCGTGCATAG					
AR13	GATATCTATT	TTTAAAGCTC	CCCC-TTTCG	CGGTTGCCCC	CACCCACACC
CCGTGCATAG					
US	GATATCTATT	TTTAAAGCTC	CCCC-TTTCG	CGGTTGCCCC	CACCCACACC
CC-TGCATAG					
AR11	GATATCTATT	TTTAAAGCTC	CCCC-TTTCG	CGGTTGCCCC	CACCCACACC
CC-TGCATAG					
AR14	GATATCTATT	TTTAAAGCTC	CCCC-TTTCG	CGGTTGCCCC	CACCCACACC
CCGTGCATAG					
AR16	GATATCTATT	TTTAAAGCTC	CCCCATTTTCG	CGGTTGCCCC	CACCCACACC
CCGTGCATAG					
AR1	GATATCTATT	TTTAAAGCTC	CCCC-TTTCG	CGGTTGCCCC	CACCCACACC
CC-TGCATAG					
AR6	GATATCTATT	TTTAAAGCTC	CCCC-TTTCG	CGGTTGCCCC	CACCCACACC
CC-TGCATAG					
AR8	GATATCTATT	TTTAAAGCTC	CCCC-TTTCG	CGGTTGCCCC	CACCCACACC
CC-TGCATAG					
AR3	GATATCTATT	TTTAAAGCTC	CCCC-TTTCG	CGGTTGCCCC	CACCCACACC
CC-TGCATAG					
AR7	GATATCTATT	TTTAAAGCTC	CCCC-TTTCG	CGGTTGCCCC	CACCCACACC
CC-TGCATAG					
AR4	GATATCTATT	TTTAAAGCTC	CCCC-TTTCG	CGGTTGCCCC	CACCCACACC
CC-TGCATAG					
AR2	GATATCTATT	TTTAAAGCTC	CCCC-TTTCG	CGGTTGCCCC	CACCCACACC
CC-TGCATAG					
AR10	GATATCTATT	TTTAAAGCTC	CCCC-TTTCG	CGGTTGCCCC	CACCCACACC
CC-TGCATAG					
AR9	GATATCTATT	TTTAAAGCTC	CCCC-TTTCG	CGGTTGCCCC	CACCCACACC
CC-TGCATAG					
AR18	GATATCTATT	TTTAAAGCTC	CCCC-TTTCG	CGGTTGCCCC	CACCCACACC
CCGTGCATAG					
AR20	GATATCTATT	TTTAAAGCTC	CCCCATTTTCG	CGGTTGCCCC	CACCCACACC
CCGTGCATAG					
AR15	GATATCTATT	TTTAAAGCTC	CCCC-TTTCG	CGGTTGCCCC	CACCCACACC
CCGTGCATAG					
AR19	GATATCTATT	TTTAAAGCTC	CCCC-TTTCG	CGGTTGCCCC	CACCCACACC
CCGTGCATAG					
AR21	GATATCTATT	TTTAAAGCTC	CCCC-TTTCG	CGGTTGCCCC	CACCCACACC
CCGTGCATAG					
AR22	GATATCTATT	TTTAAAGCTC	CCCCATTTTCG	CGGTTGCCCC	CACCCACACC
CCGTGCATAG					

	1205	1215	1225	1235	1245
1255					
AR12	GTTTTTGTA	TAGGTTCCAT	ATACCCAGGG	CGGCGACTAT	TAACACTCTC
TCAGACTGAT					
JA	GTTTTTGTA	TAGGTTCCAT	ATACCCAGGG	CGGCGACTAT	TAACACTCTC
TCAGACTGAT					
UK1	GTTTTTGTA	TAGGTTCCAT	ATACCCAGGG	CGGCGACTAT	TAACACTCTC
TCAGACTGAT					
UK2	GTTTTTGTA	TAGGTTCCAT	ATACCCAGGG	CGGCGACTAT	TAACACTCTC
TCAGACTGAT					
AR17	GTTTTTGTA	TAGGTTCCAT	ATACCCAGGG	CGGCGACTAT	TAACACTCTC
TCAGACTGAT					
AR13	GTTTTTGTA	TAGGTTCCAT	ATACCCAGGG	CGGCGACTAT	TAACACTCTC
TCAGACTGAT					

US	GTTTTTGTAA	TAGGTTCCAT	ATACCCAGGG	CGGCGACTAT	TAACACTCTC
TCAGACTGAT					
AR11	GTTTTTGTAA	TAGGTTCCAT	ATACCCAGGG	CGGCGACTAT	TAACACTCTC
TCAGACTGAT					
AR14	GTTTTTGTAA	TAGGTTCCAT	ATACCCAGGG	CGGCGACTAT	TAACACTCTC
TCAGACTGAT					
AR16	GTTTTTGTAA	TAGGTTCCAT	ATACCCAGGG	CGGCGACTAT	TAACACTCTC
TCAGACTGAT					
AR1	GTTTTTGTAA	TAGGTTCCAT	ATACCCAGGG	CGGCGACTAT	TAACACTCTC
TCAGACTGAT					
AR6	GTTTTTGTAA	TAGGTTCCAT	ATACCCAGGG	CGGCGACTAT	TAACACTCTC
TCAGACTGAT					
AR8	GTTTTTGTAA	TAGGTTCCAT	ATACCCAGGG	CGGCGACTAT	TAACACTCTC
TCAGACTGAT					
AR3	GTTTTTGTAA	TAGGTTCCAT	ATACCCAGGG	CGGCGACTAT	TAACACTCTC
TCAGACTGAT					
AR7	GTTTTTGTAA	TAGGTTCCAT	ATACCCAGGG	CGGCGACTAT	TAACACTCTC
TCAGACTGAT					
AR4	GTTTTTGTAA	TAGGTTCCAT	ATACCCAGGG	CGGCGACTAT	TAACACTCTC
TCAGACTGAT					
AR2	GTTTTTGTAA	TAGGTTCCAT	ATACCCAGGG	CGGCGACTAT	TAACATGCTC
TCAGACTGAT					
AR10	GTTTTTGTAA	TAGGTTCCAT	ATACCCAGGG	CGGCGACTAT	TAACACTCTC
TCAGACTGAT					
AR9	GTTTTTGTAA	TAGGTTCCAT	ATACCCAGGG	CGGCGACTAT	TAACACTCTC
TCAGACTGAT					
AR18	GTTTTTGTAA	TAGGTTCCAT	ATACCCAGGG	CGGCGACTAT	TAACACTCTC
TCAGACTGAT					
AR20	GTTTTTGTAA	TAGGTTCCAT	ATACCCAGGG	CGGCGACTAT	TAACACTCTC
TCAGACTGAT					
AR15	GTTTTTGTAA	TAGGTTCCAT	ATACCCAGGG	CGGCGACTAT	TAACACTCTC
TCAGACTGAT					
AR19	GTTTTTGTAA	TAGGTTCCAT	ATACCCAGGG	CGGCGACTAT	TAACACTCTC
TCAGACTGAT					
AR21	GTTTTTGTAA	TAGGTTCCAT	ATACCCAGGG	CGGCGACTAT	TAACACTCTC
TCAGACTGAT					
AR22	GTTTTTGTAA	TAGGTTCCAT	ATACCCAGGG	CGGCGACTAT	TAACACTCTC
TCAGACTGAT					

	1265	1275	1285	1295	1305
1315					
AR12	AGTAAACTTT	TTAAAAAAAC	AGCTTTATTT	AAAAATGGGG	GTACAAAAC
TTACAGGTGT					
JA	AGTAAACTTT	TTAAAAAAAC	AGCTTTATTT	AAAAATGGGG	GTACAAAAC
TTACAGGTGT					
UK1	AGTAAACTTT	TTAAAAAAAC	AGCTTTATTT	AAAAATGGGG	GTACAAAAC
TTACAGGTGT					
UK2	AGTAAACTTT	TTAAAAAAAC	AGCTTTATTT	AAAAATGGGG	GTACAAAAC
TTACAGGTGT					
AR17	AGTAAACTTT	TTAAAAAAAC	AGCTTTATTT	AAAAATGGGG	GTACAAAAC
TTACAGGTGT					
AR13	AGTAAACTTT	TTAAAAAAAC	AGCTTTATTT	AAAAATGGGG	GTACAAAAC
TTACAGGTGT					
US	AGTAAACTTT	TTAAAAAAAC	AGCTTTATTT	AAAAATGGGG	GTACAAAAC
TTACAGGTGT					
AR11	AGTAAACTTT	TTAAAAAAAC	AGCTTTATTT	AAAAATGGGG	GTACAAAAC
TTACAGGTGT					
AR14	AGTAAACTTT	TTAAAAAAAC	AGCTTTATTT	AAAAATGGGG	GTACAAAAC
TTACAGGTGT					

AR16	AGTAAACTTT	TTAAAAAAC	AGCTTTATTT	AAAAATGGGG	GTACAAAAC
TTACAGGTGT					
AR1	AGTAAACTTT	TTAAAAAAC	AGCTTTATTT	AAAAATGGGG	GTACAAAAC
TTACAGGTGT					
AR6	AGTAAACTTT	TTAAAAAAC	AGCTTTATTT	AAAAATGGGG	GTACAAAAC
TTACAGGTGT					
AR8	AGTAAACTTT	TTAAAAAAC	AGCTTTATTT	AAAAATGGGG	GTACAAAAC
TTACAGGTGT					
AR3	AGTAAACTTT	TTAAAAAAC	AGCTTTATTT	AAAAATGGGG	GTACAAAAC
TTACAGGTGT					
AR7	AGTAAACTTT	TTAAAAAAC	AGCTTTATTT	AAAAATGGGG	GTACAAAAC
TTACAGGTGT					
AR4	AGTAAACTTT	TTAAAAAAC	AGCTTTATTT	AAAAATGGGG	GTACAAAAC
TTACAGGTGT					
AR2	AGTAAACTTT	TTAAAAAAC	AGCTTTATTT	AAAAATGGGG	GTACAAAAC
TTACAGGTGT					
AR10	AGTAAACTTT	TTAAAAAAC	AGCTTTATTT	AAAAATGGGG	GTACAAAAC
TTACAGGTGT					
AR9	AGTAAACTTT	TTAAAAAAC	AGCTTTATTT	AAAAATGGGG	GTACAAAAC
TTACAGGTGT					
AR18	AGTAAACTTT	TTAAAAAAC	AGCTTTATTT	AAAAATGGGG	GTACAAAAC
TTACAGGTGT					
AR20	AGTAAACTTT	TTAAAAAAC	AGCTTTATTT	AAAAATGGGG	GTACAAAAC
TTACAGGTGT					
AR15	AGTAAACTTT	TTAAAAAAC	AGCTTTATTT	AAAAATGGGG	GTACAAAAC
TTACAGGTGT					
AR19	AGTAAACTTT	TTAAAAAAC	AGCTTTATTT	AAAAATGGGG	GTACAAAAC
TTACAGGTGT					
AR21	AGTAAACTTT	TTAAAAAAC	AGCTTTATTT	AAAAATGGGG	GTACAAAAC
TTACAGGTGT					
AR22	AGTAAACTTT	TTAAAAAAC	AGCTTTATTT	AAAAATGGGG	GTACAAAAC
TTACAGGTGT					

AR12	GGTAAAAAAG	TTATTGGTTT	CTCCGGTATC	TTTGGCAGTT	GTGGGGACAT
CGCATCTCCT					
JA	GGTAAAAAAG	TTATTGGTTT	CTCCGGTATC	TTTGGCAGTT	GTGGGGACAT
CGCATCTCCT					
UK1	GGTAAAAAAG	TTATTGGTTT	CTCCGGTATC	TTTGGCAGTT	GTGGGGACAT
CGCATCTCCT					
UK2	GGTAAAAAAG	TTATTGGTTT	CTCCGGTATC	TTTGGCAGTT	GTGGGGACAT
CGCATCTCCT					
AR17	GGTAAAAAAG	TTATTGGTTT	CTCCGGTATC	TTTGGCAGTT	GTGGGGACAT
CGCATCTCCT					
AR13	GGTAAAAAAG	TTATTGGTTT	CTCCGGTATC	TTTGGCAGTT	GTGGGGACAT
CGCATCTCCT					
US	GGTAAAAAAG	TTATTGGTTT	CTCCGGTATC	TTTGGCAGTT	GTGGGGACAT
CGCATCTCCT					
AR11	GGTAAAAAAG	TTATTGGTTT	CTCCGGTATC	TTTGGCAGTT	GTGGGGACAT
CGCATCTCCT					
AR14	GGTAAAAAAG	TTATTGGTTT	CTCCGGTATC	TTTGGCAGTT	GTGGGGACAT
CGCATCTCCT					
AR16	GGTAAAAAAG	TTATTGGTTT	CTCCGGTATC	TTTGGCAGTT	GTGGGGACAT
CGCATCTCCT					
AR1	GGTAAAAAAG	TTATTGGTTT	CTCCGGTATC	TTTGGCAGTT	GTGGGGACAT
CGCATCTCCT					
AR6	GGTAAAAAAG	TTATTGGTTT	CTCCGGTATC	TTTGGCAGTT	GTGGGGACAT
CGCATCTCCT					

AR8	GGTAAAAAAG	TTATTGGTTT	CTCCGGTATC	TTTGGCAGTT	GTGGGGACAT
CGCATCTCCT					
AR3	GGTAAAAAAG	TTATTGGTTT	CTCCGGTATC	TTTGGCAGTT	GTGGGGACAT
CGCATCTCCT					
AR7	GGTAAAAAAG	TTATTGGTTT	CTCCGGTATC	TTTGGCAGTT	GTGGGGACAT
CGCATCTCCT					
AR4	GGTAAAAAAG	TTATTGGTTT	CTCCGGTATC	TTTGGCAGTT	GTGGGGACAT
CGCATCTCCT					
AR2	GGTAAAAAAG	TTATTGGTTT	CTCCGGTATC	TTTGGCAGTT	GTGGGGACAT
CGCATCTCCT					
AR10	GGTAAAAAAG	TTATTGGTTT	CTCCGGTATC	TTTGGCAGTT	GTGGGGACAT
CGCATCTCCT					
AR9	GGTAAAAAAG	TTATTGGTTT	CTCCGGTATC	TTTGGCAGTT	GTGGGGACAT
CGCATCTCCT					
AR18	GGTAAAAAAG	TTATTGGTTT	CTCCGGTATC	TTTGGCAGTT	GTGGGGACAT
CGCATCTCCT					
AR20	GGTAAAAAAG	TTATTGGTTT	CTCCGGTATC	TTTGGCAGTT	GTGGGGACAT
CGCATCTCCT					
AR15	GGTAAAAAAG	TTATTGGTTT	CTCCGGTATC	TTTGGCAGTT	GTGGGGACAT
CGCATCTCCT					
AR19	GGTAAAAAAG	TTATTGGTTT	CTCCGGTATC	TTTGGCAGTT	GTGGGGACAT
CGCATCTCCT					
AR21	GGTAAAAAAG	TTATTGGTTT	CTCCGGTATC	TTTGGCAGTT	GTGGGGACAT
CGCATCTCCT					
AR22	GGTAAAAAAG	TTATTGGTTT	CTCCGGTATC	TTTGGCAGTT	GTGGGGACAT
CGCATCTCCT					

	1385	1395	1405	1415	1425
1435					
AR12	CTGGTTCAGC	GGGCTGTGTC	TGAAACGCC	GTTGCAGGTC	ACGGACACGC
TGACCCCCTT					
JA	CTGGTTCAGC	GGGCTGTGTC	TGAAACGCC	GTTGCAGGTC	ACGGACACGC
TGACCCCCTT					
UK1	CTGGTTCAGC	GGGCTGTGTC	TGAAACGCC	GTTGCAGGTC	ACGGACACGC
TGACCCCCTT					
UK2	CTGGTTCAGC	GGGCTGTGTC	TGAAACGCC	GTTGCAGGTC	ACGGACACGC
TGACCCCCTT					
AR17	CTGGTTCAGC	GGGCTGTGTC	TGAAACGCC	GTTGCAGGTC	ACGGACACGC
TGACCCCCTT					
AR13	CTGGTTCAGC	GGGCTGTGTC	TGAAACGCC	GTTGCAGGTC	ACGGACACGC
TGACCCCCTT					
US	CTGGTTCAGC	GGGCTGTGTC	TGAAACGCC	GTTGCAGGTC	ACGGACACGC
TGACCCCCTT					
AR11	CTGGTTCAGC	GGGCTGTGTC	TGAAACGCC	GTTGCAGGTC	ACGGACACGC
TGACCCCCTT					
AR14	CTGGTTCAGC	GGGCTGTGTC	TGAAACGCC	GTTGCAGGTC	ACGGACACGC
TGACCCCCTT					
AR16	CTGGTTCAGC	GGGCTGTGTC	TGAAACGCC	GTTGCAGGTC	ACGGACACGC
TGACCCCCTT					
AR1	CTGGTTCAGC	GGGCTGTGTC	TGAAACGCC	GTTGCAGGTC	ACGGACACGC
TGACCCCCTT					
AR6	CTGGTTCAGC	GGGCTGTGTC	TGAAACGCC	GTTGCAGGTC	ACGGACACGC
TGACCCCCTT					
AR8	CTGGTTCAGC	GGGCTGTGTC	TGAAACGCC	GTTGCAGGTC	ACGGACACGC
TGACCCCCTT					
AR3	CTGGTTCAGC	GGGCTGTGTC	TGAAACGCC	GTTGCAGGTC	ACGGACACGC
TGACCCCCTT					
AR7	CTGGTTCAGC	GGGCTGTGTC	TGAAACGCC	GTTGCAGGTC	ACGGACACGC
TGACCCCCTT					

AR4	CTGGTTCAGC	GGGCTGTGTC	TGAAACGCCC	GTTGCAGGTC	ACGGACACGC
TGACCCCCTT					
AR2	CTGGTTCAGC	GGGCTGTGTC	TGAAACGCCC	GTTGCAGGTC	ACGGACACGC
TGACCCCCTT					
AR10	CTGGTTCAGC	GGGCTGTGTC	TGAAACGCCC	GTTGCAGGTC	ACGGACACGC
TGACCCCCTT					
AR9	CTGGTTCAGC	GGGCTGTGTC	TGAAACGCCC	GTTGCAGGTC	ACGGACACGC
TGACCCCCTT					
AR18	CTGGTTCAGC	GGGCTGTGTC	TGAAACGCCC	GTTGCAGGTC	ACGGACACGC
TGACCCCCTT					
AR20	CTGGTTCAGC	GGGCTGTGTC	TGAAACGCCC	GTTGCAGGTC	ACGGACACGC
TGACCCCCTT					
AR15	CTGGTTCAGC	GGGCTGTGTC	TGAAACGCCC	GTTGCAGGTC	ACGGACACGC
TGACCCCCTT					
AR19	CTGGTTCAGC	GGGCTGTGTC	TGAAACGCCC	GTTGCAGGTC	ACGGACACGC
TGACCCCCTT					
AR21	CTGGTTCAGC	GGGCTGTGTC	TGAAACGCCC	GTTGCAGGTC	ACGGACACGC
TGACCCCCTT					
AR22	CTGGTTCAGC	GGGCTGTGTC	TGAAACGCCC	GTTGCAGGTC	ACGGACACGC
TGACCCCCTT					

1445 1455 1465 1475 1485

1495					
AR12	GTCTAATCAA	TGGGCTGGTG	GACGCTATGT	CTGGGTAGGG	CACCGGGGGC
ACACTCTGCC					
JA	GTCTAATCAA	TGGGCTGGTG	GACGCTATGT	CTGGGTAGGG	CACCGGGGGC
ACACTCTGCC					
UK1	GTCTAATCAA	TGGGCTGGTG	GACGCTATGT	CTGGGTAGGG	CACCGGGGGC
ACACTCTGCC					
UK2	GTCTAATCAA	TGGGCTGGTG	GACGCTATGT	CTGGGTAGGG	CACCGGGGGC
ACACTCTGCC					
AR17	GTCTAATCAA	TGGGCTGGTG	GACGCTATGT	CTGGGTAGGG	CACCGGGGGC
ACACTCTGCC					
AR13	GTCTAATCAA	TGGGCTGGTG	GACGCTATGT	CTGGGTAGGG	CACCGGGGGC
ACACTCTGCC					
US	GTCTAATCAA	TGGGCTGGTG	GACGCTATGT	CTGGGTAGGG	CACCGGGGGC
ACACTCTGCC					
AR11	GTCTAATCAA	TGGGCTGGTG	GACGCTATGT	CTGGGTAGGG	CACCGGGGGC
ACACTCTGCC					

AR14	GTCTAATCAA	TGGGCTGGTG	GACGCTATGT	CTGGGTAGGG	CACCGGGGGC
ACACTCTGCC					
AR16	GTCTAATCAA	TGGGCTGGTG	GACGCTATGT	CTGGGTAGGG	CACCGGGGGC
ACACTCTGCC					
AR1	GTCTAATCAA	TGGGCTGGTG	GACGCTATGT	CTGGGTAGGG	CACCGGGGGC
ACACTCTGCC					
AR6	GTCTAATCAA	TGGGCTGGTG	GACGCTATGT	CTGGGTAGGG	CACCGGGGGC
ACACTCTGCC					
AR8	GTCTAATCAA	TGGGCTGGTG	GACGCTATGT	CTGGGTAGGG	CACCGGGGGC
ACACTCTGCC					
AR3	GTCTAATCAA	TGGGCTGGTG	GACGCTATGT	CTGGGTAGGG	CACCGGGGGC
ACACTCTGCC					
AR7	GTCTAATCAA	TGGGCTGGTG	GACGCTATGT	CTGGGTAGGG	CACCGGGGGC
ACACTCTGCC					
AR4	GTCTAATCAA	TGGGCTGGTG	GACGCTATGT	CTGGGTAGGG	CACCGGGGGC
ACACTCTGCC					
AR2	GTCTAATCAA	TGGGCTGGTG	GACGCTATGT	CTGGGTAGGG	CACCGGGGGC
ACACTCTGCC					
AR10	GTCTAATCAA	TGGGCTGGTG	GACGCTATGT	CTGGGTAGGG	CACCGGGGGC
ACACTCTGCC					

AR9	GTCTAATCAA TGGGCTGGTG GACGCTATGT CTGGGTAGGG CACCGGGGGC
ACACTCTGCC	
AR18	GTCTAATCAA TGGGCTGGTG GACGCTATGT CTGGGTAGGG CACCGGGGGC
ACACTCTGCC	
AR20	GTCTAATCAA TGGGCTGGTG GACGCTATGT CTGGGTAGGG CACCGGGGGC
ACACTCTGCC	
AR15	GTCTAATCAA TGGGCTGGTG GACGCTATGT CTGGGTAGGG CACCGGGGGC
ACACTCTGCC	
AR19	GTCTAATCAA TGGGCTGGTG GACGCTATGT CTGGGTAGGG CACCGGGGGC
ACACTCTGCC	
AR21	GTCTAATCAA TGGGCTGGTG GACGCTATGT CTGGGTAGGG CACCGGGGGC
ACACTCTGCC	
AR22	GTCTAATCAA TGGGCTGGTG GACGCTATGT CTGGGTAGGG CACCGGGGGC
ACACTCTGCC	

1505

AR12	GTCTCGGTCT
JAF	GTCTCGGTCT
UK1	GTCTCGGTCT
UK2	GTCTCGGTCT
AR17	GTCTCGGTCT
AR13	GTCTCGGTCT
US	GTCTCGGTCT
AR11	GTCTCGGTCT
AR14	GTCTCGGTCT
AR16	GTCTCGGTCT
AR1	GTCTCGGTCT
AR6	GTCTCGGTCT
AR8	GTCTCGGTCT
AR3	GTCTCGGTCT
AR7	GTCTCGGTCT
AR4	GTCTCGGTCT
AR2	GTCTCGGTCT
AR10	GTCTCGGTCT
AR9	GTCTCGGTCT
AR18	GTCTCGGTCT
AR20	GTCTCGGTCT
AR15	GTCTCGGTCT
AR19	GTCTCGGTCT
AR21	GTCTCGGTCT
AR22	GTCTCGGTCT

Fig. 26. Tabla de identidad de 25 cepas de EHV-1 aisladas de distintos lugares geográficos.

	AR1	AR2	AR3	AR4	AR6	AR7	AR8	AR9	AR10	AR11	AR12	AR13	AR14	AR15	AR16	AR17	AR18	AR19	AR20	AR21	AR22	JA	US	UK1	UK2	
AR1	99.73	99.79	99.79	99.79	99.79	99.79	99.86	99.86	99.72	99.79	99.86	99.86	99.86	99.79	99.86	99.86	99.86	99.79	99.86	99.86	99.86	99.79	99.59	99.86	99.52	
AR2	-	99.79	99.93	99.73	99.79	99.79	99.86	99.86	99.93	99.79	99.86	99.79	99.86	100	100	99.93	100	99.93	99.79	99.86	99.79	99.7	99.59	99.8	99.82	
AR3	-	99.93	99.79	99.86	99.93	99.86	99.93	99.93	99.79	99.72	99.9	99.9	99.9	99.86	99.93	99.93	99.93	99.86	99.93	99.93	99.93	99.8	99.66	99.9	99.59	
AR4	-	99.86	100	99.93	99.73	99.86	99.73	99.86	99.86	99.86	100	99.93	99.93	100	100	99.79	99.86	100	99.72	99.86	99.86	99.9	99.86	100	99.73	
AR6	-	99.93	99.79	100	99.86	99.93	99.9	99.9	99.86	99.93	99.9	100	100	99.86	99.86	99.86	99.93	99.86	99.72	99.86	100	100	99.59	99.86	99.86	
AR7	-	99.86	99.79	99.93	100	99.86	99.79	99.93	100	99.86	99.79	99.86	99.72	99.86	99.93	99.72	99.86	100	99.86	99.79	99.86	99.8	99.73	99.9	99.79	
AR8	-	99.93	100	99.93	100	99.86	100	99.93	100	99.86	100	99.79	99.86	100	99.93	100	99.73	99.86	99.93	99.93	100	99.9	99.86	99.9	99.59	
AR9	-	99.93	100	99.93	100	99.86	100	99.93	100	99.86	100	99.72	99.86	99.93	99.86	99.72	99.86	99.93	99.93	99.72	99.72	99.9	99.86	100	99.86	
AR10	-	99.86	99.86	99.86	99.72	100	100	99.86	99.86	99.72	99.93	99.86	99.72	99.93	99.86	99.72	99.86	100	99.86	100	99.93	99.7	100	99.8	99.59	
AR11	-	99.72	100	99.93	99.86	99.72	100	99.86	99.86	99.72	99.93	99.86	99.86	100	99.86	99.93	99.86	100	99.86	99.93	99.93	99.7	99.86	99.7	99.93	
AR12	-	99.72	100	99.93	99.86	99.72	100	99.86	99.86	99.72	99.93	99.86	99.86	100	99.86	99.93	99.86	100	99.86	99.93	99.93	99.7	99.86	99.7	99.93	
AR13	-	99.72	100	99.93	99.86	99.72	100	99.86	99.86	99.72	99.93	99.86	99.86	100	99.86	99.93	99.86	100	99.86	99.93	99.93	99.7	99.86	99.7	99.93	
AR14	-	99.86	99.73	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93
AR15	-	99.86	99.73	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93
AR16	-	99.86	99.73	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93
AR17	-	99.86	99.73	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93
AR18	-	99.86	99.73	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93
AR19	-	99.86	99.73	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93
AR20	-	99.86	99.73	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93
AR21	-	99.86	99.73	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93
AR22	-	99.86	99.73	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93
JA	-	99.86	99.73	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93
US	-	99.86	99.73	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93
UK1	-	99.86	99.73	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93
UK2	-	99.86	99.73	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93	99.93

Fig. 27. Dendrograma obtenido mediante el cálculo de distancias de Hasegawa, Kishino y Yano (HKY 85) utilizando el algoritmo de Neighbor-Joining (Saitou & Nei, 1987).

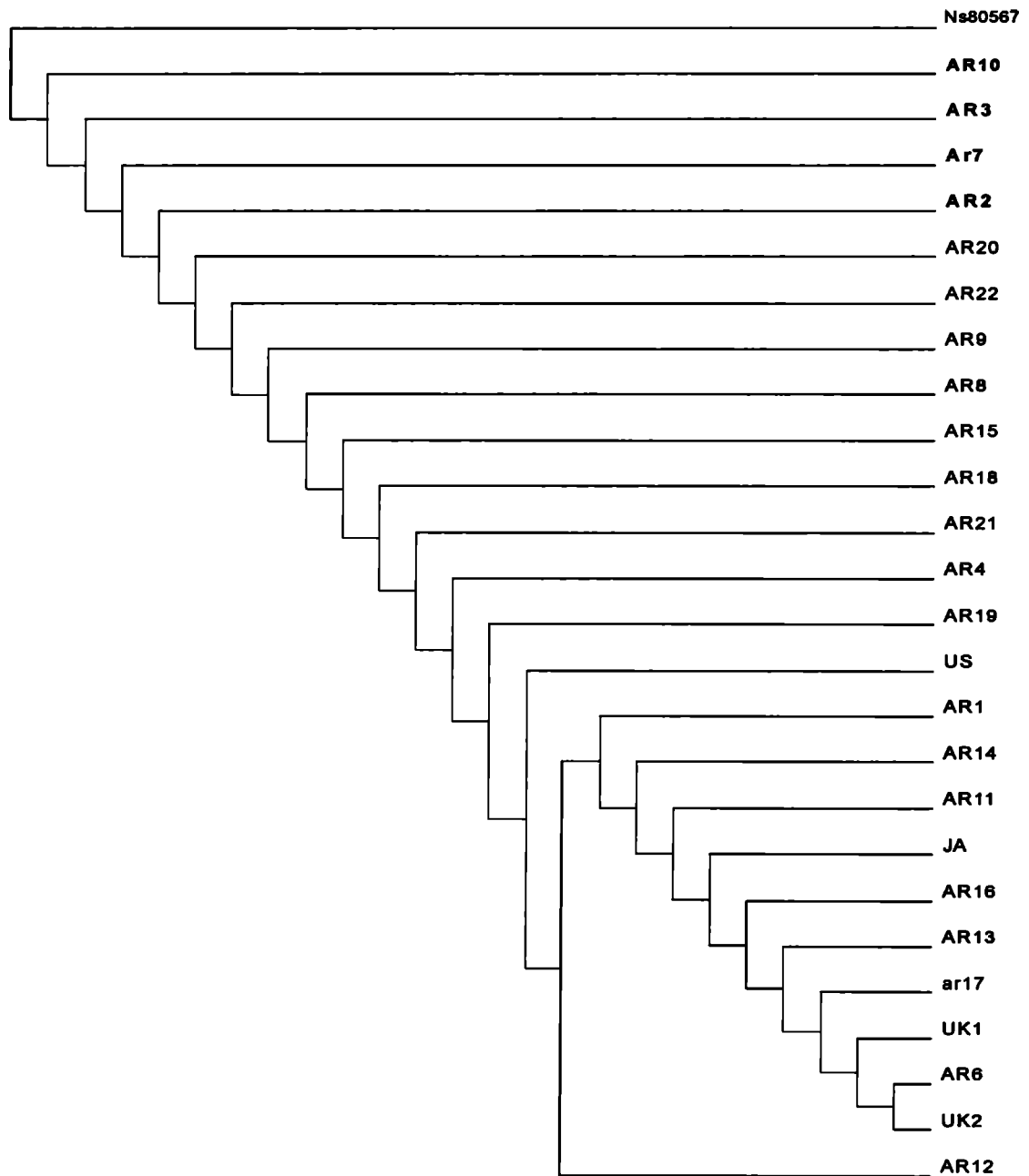


Fig. 28. Árbol óptimo obtenido mediante las rutinas de parsimonia del programa TNT (*Tree Analysis using New Technologies*) utilizando pesos iguales.

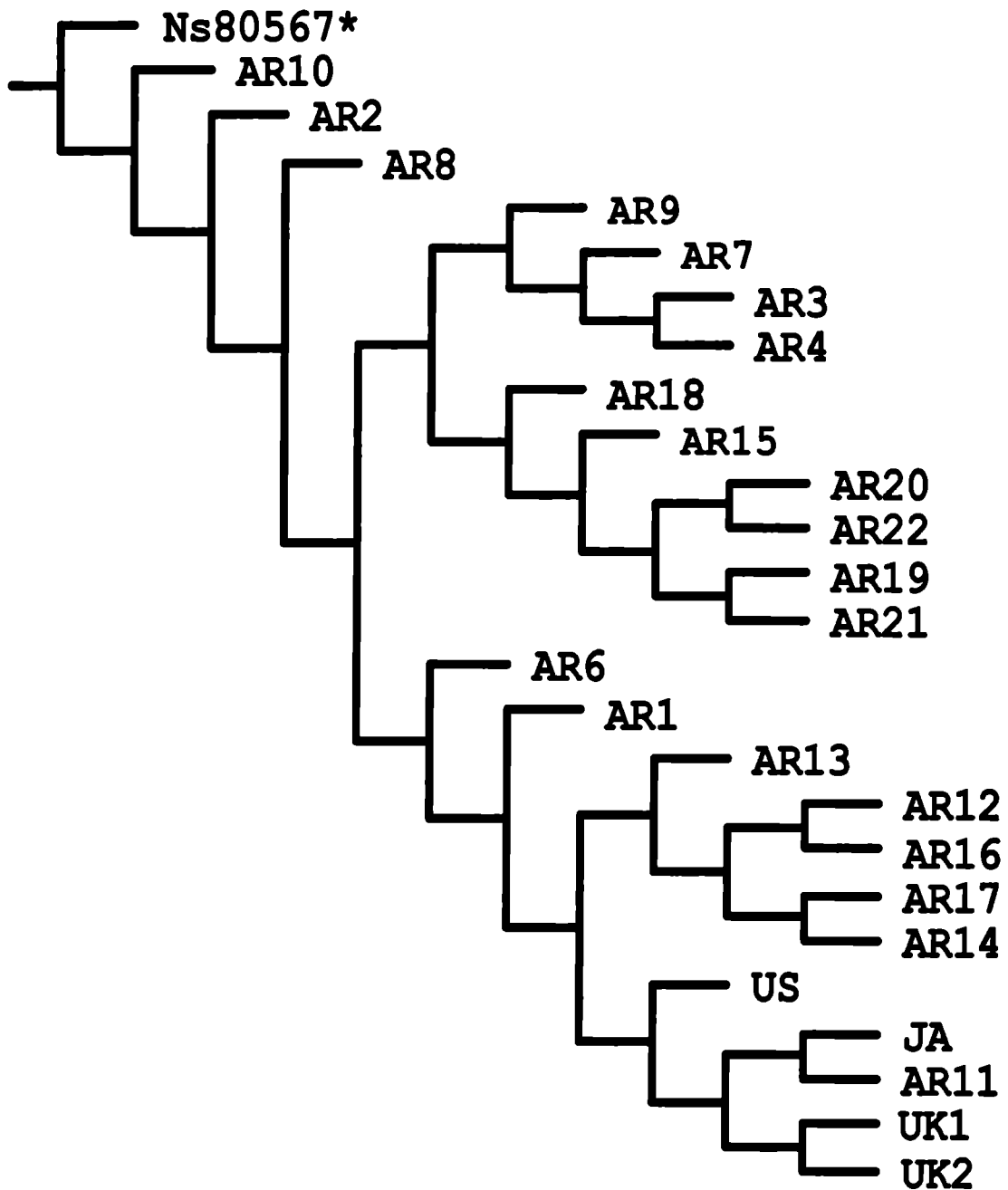


Fig. 29. Árbol filogenético obtenido mediante las rutinas de Maxima Verosimilitud del programa PAUP* utilizando el modelo evolutivo HKY85.

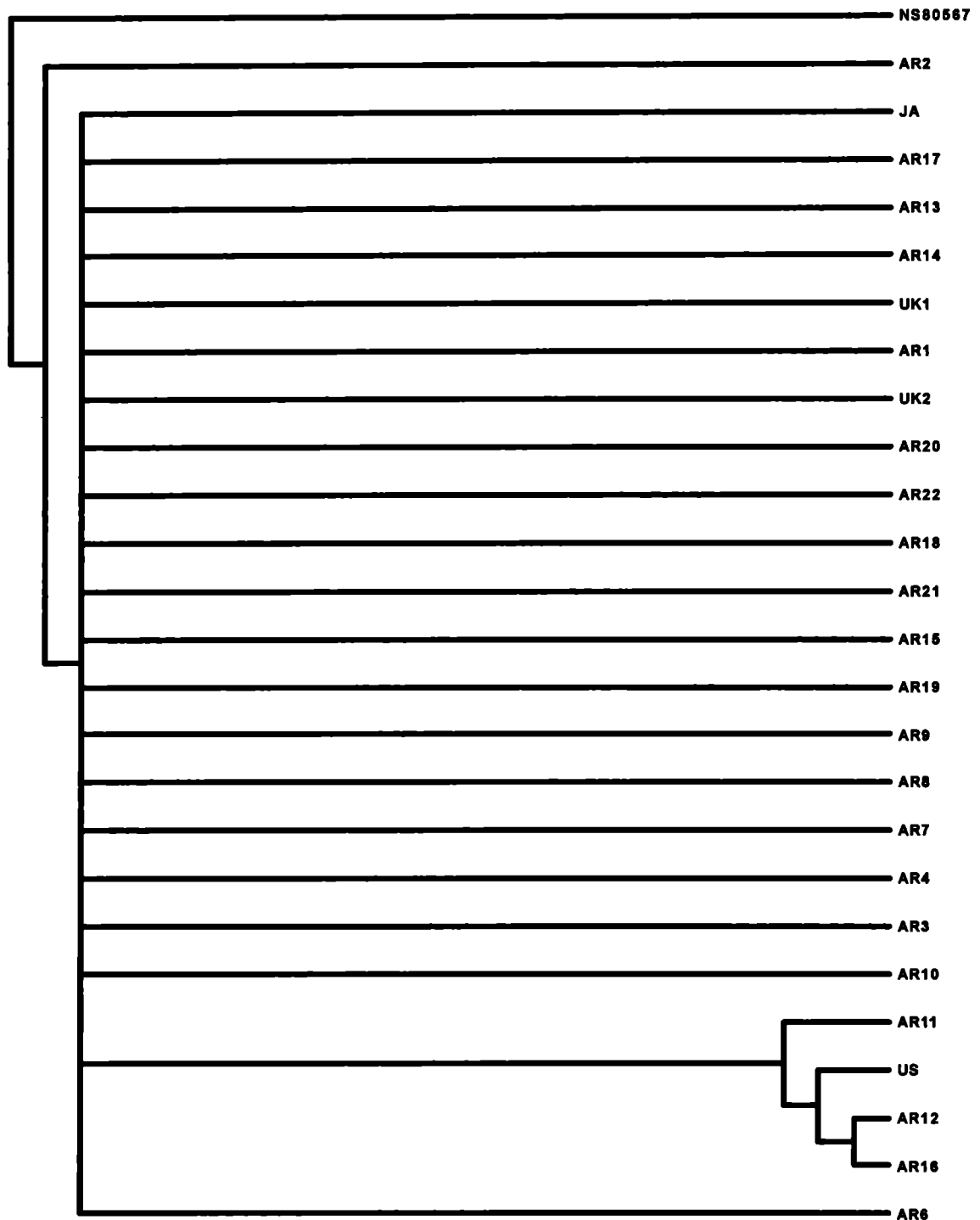


Fig. 30. Valores de *bootstrap* obtenidos mediante la aplicación del programa TNT, para el árbol calculado mediante parsimonia. Los valores de bootstrap fueron obtenidos realizando 1000 remuestreos. El asterisco indica el taxón utilizado como *outgroup* (OG).

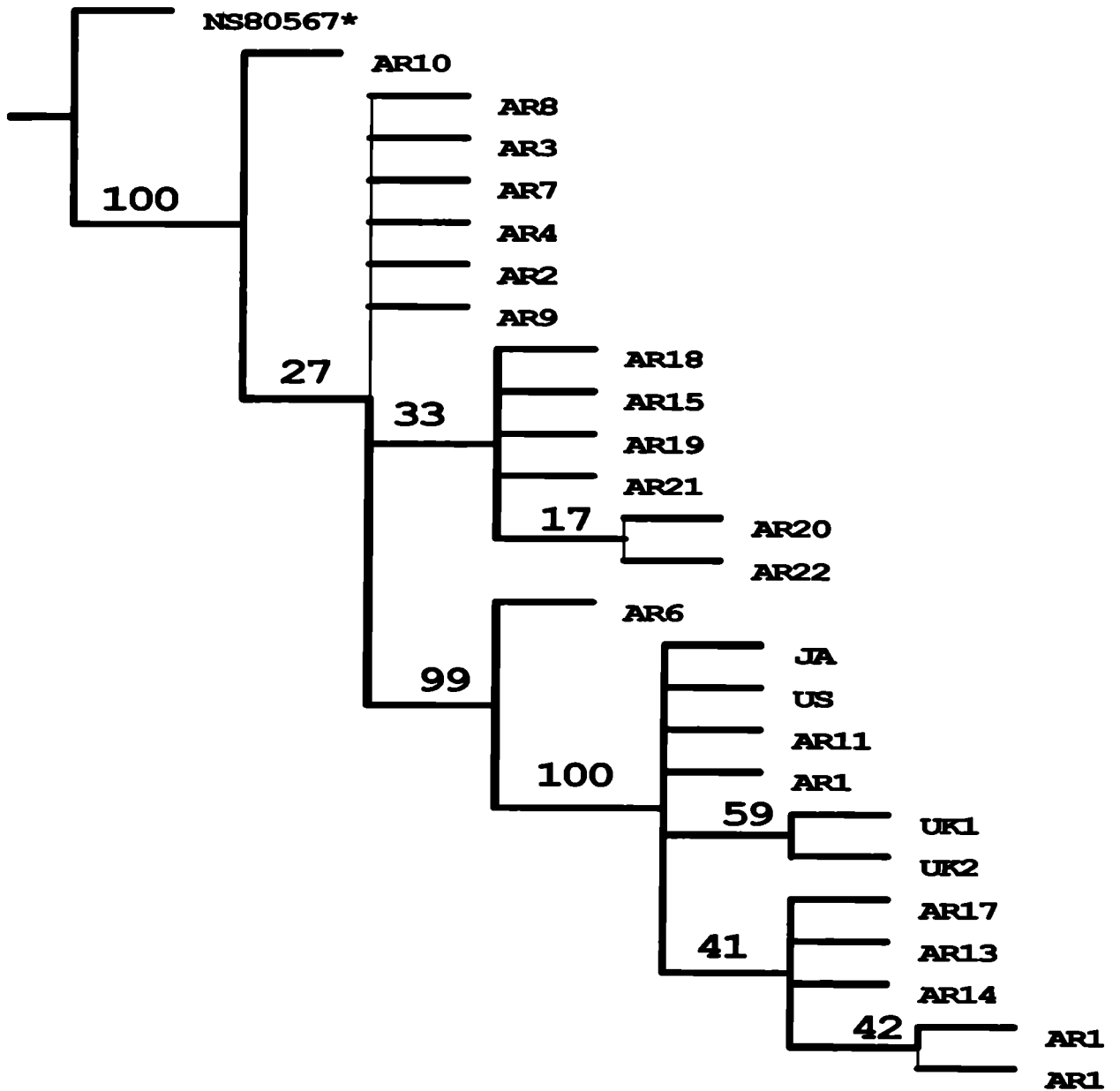


Fig. 31. Valores de soporte calculados mediante *jackknife* utilizando el programa TNT. El asterisco indica el taxón utilizado como *outgroup* (OG).

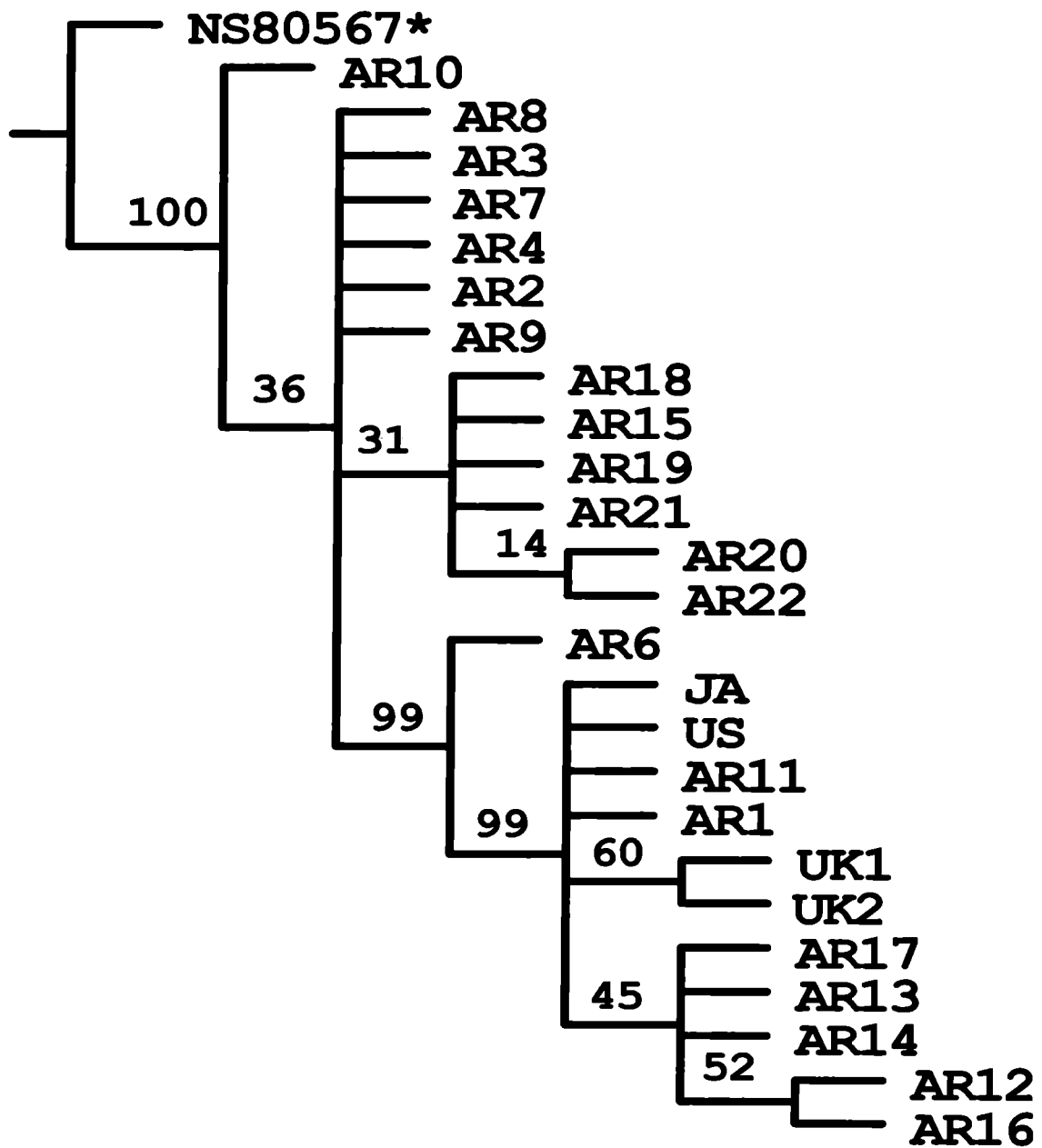
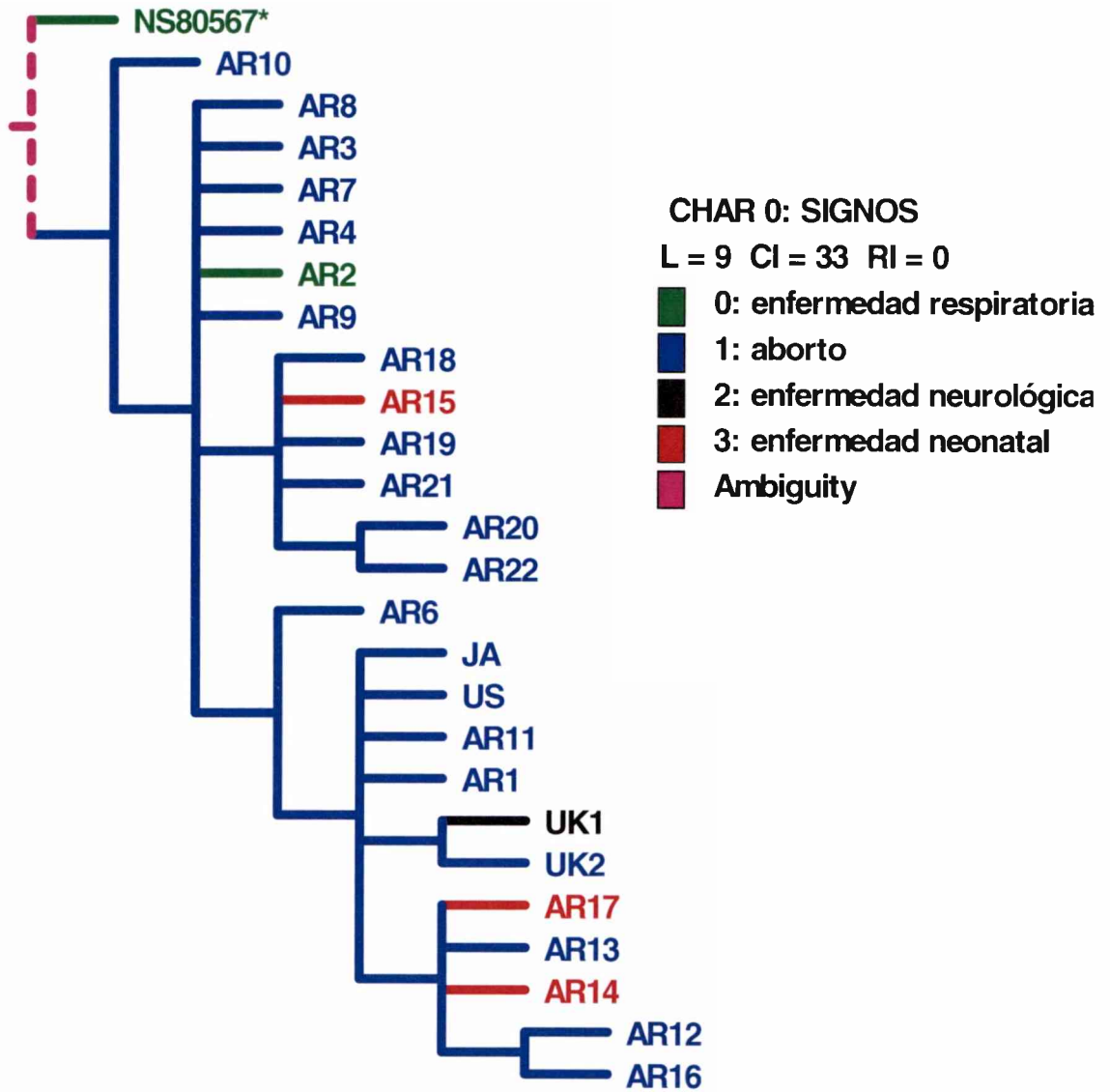


Fig. 32. Reconstrucción de la evolución del carácter “signos” mediante optimización del mismo en las cepas de EHV-1 analizadas en este trabajo. La optimización del carácter se realizó sobre el cladograma obtenido mediante bootstrap utilizando la opción “*unanambiguous*” del programa *Winclada*.



7. Bibliografía



7. BIBLIOGRAFÍA

1. Allen GP & Mc Collum. 1983. Molecular epizootiologic studies of equine herpesvirus-1 infections by restriction endonuclease fingerprinting of viral DNA. *Am. J. Vet. Res.*, 44:263-271.
2. Allen GP, Yeargan MK, Turtinen LW, Bryans, JT. 1985. A new field strain of equine abortion virus (equine herpesvirus-1) among Kentucky horses. *Am. J. Vet. Res.*, 46: 138-144.
3. Allen GP, Bryans JT. 1986. Molecular epizootiology, pathogenesis and prophylaxis of equine herpesvirus -1 infections. In Pandey, R. (Ed), *Progress in Veterinary Microbiology and Immunology*, vol 2, S. Karger, Basel, pp 78-144.
4. Allen GP, Kidd JH, Slater JD, Smith KC. 1998. Advances in understanding of the pathogenesis, epidemiology and immunological control of equine herpesvirus abortion. *Proc. 8th Int. Conf. Eq. Inf. Dis.* Eds: U Wernery, JF Wade JA Mumford, Kaaden OR, R& W Publications (Newmarket) pp 129-146.
5. Ahmed M, Lock M, Miller CG, & Fraser NW. 2002. Region of the herpes simplex virus type 1 latency-associated transcripts that protect cells from apoptosis in vitro and protect neuronal cells in vivo. *J. Virol* 76: 717-729.
6. Arnedo MA. 1999. Cladismo: La reconstrucción filogenética basada en Parsimonia. *Boletín de la Sociedad Entomológica Aragonesa* 26: 57-84
7. Awan AR, Chong YC, Field HJ. 1990. The pathogenesis of equine herpesvirus type 1 in the mouse: a new model for studying host responses to the infection. *J Gen Virol* 71: 1131-1140.
8. Awan AR, Gibson JS, Field HJ. 1991. A murine model for studying EHV-1 induced abortion. *Res. Vet. Sci.* 51: 94-99.
9. Awan AR, Field HJ. 1993. Effects of phosphonylmethoxy alkyl derivatives studied with a murine model for abortion induced by equine herpesvirus 1. *Antimicrob. Agents. Chermother.* 37: 2478-2482.
10. Awan AR, Baxi M, Field HJ. 1995. EHV-1 induced abortion in mice and its relationship to stage of gestation. *Res. Vet. Sci.* 59: 139-145.
11. Bancroft JD, Stevens A. 1990. *Theory and Practice of Histological Techniques*. 3th Edition. Ed Churchill Livingstone. New York.

12. Barbeito CG, Woudwyk M, Cacciato C, Soto P, Portiansky E, Echavarria CM, Gimeno E & Monteavaro C. 2008. *Trichomonas foetus*: experimental infection in pregnant BALB/C mice. *Exp Parasitol*, 120: 156-160.
13. Barbeito CG. 2009. Historia de las placentas y su relación con la morfología. *Ciencias Morfológicas* (en prensa).
14. Bartels T, Steinbach F, Hahn H, Ludwig H, Borchers K. 1998. In situ study on the pathogenesis and immune reaction of equine herpesvirus type 1 (EHV-1) infections in mice. *Immunology* 93: 329-334.
15. Baxi MK, Borchers K, Bartels T, Schellenbach A, Baxi S, Field HJ. 1996. Molecular studies of the acute infection, latency and reactivation of equine herpesvirus-1 (EHV-1) in the mouse model. *Virus Res.* 40:33-45.
16. Berria MI. 1998. Familia *Herpetoviridae* (Cap 19). Pp 327-338. En: Carballal, G. y Oubiña JR. (Eds.) *Virología Médica* Editorial El Ateneo, Bs As.
17. Bryant NA, Davys-Pointer N, Vanderplasschen A, Alcami A. 2003. Glycoprotein G isoforms from some alphaherpesviruses function as broad-spectrum chemokine binding proteins. *Embo J.* 22 (4): 833-846.
18. Camin JH & Sokal RR. 1965. A method for deducing branching sequences in phylogeny. *Evolution.* 19: 311-326.
19. Carlton WW & Mc Gavin MD. 1995. Reproductive system: female. In: Carlton, WW, Mc Gavin, MD. (Eds), *Thomson's Special Veterinary Pathology*. Mosby. St Louis. Pp 529-530.
20. Challis JR, Lockwood CJ, Myatt L, Norman JE, Strauss JF, Petraglia F. 2009. Inflammation and Pregnancy. *Reproductive Sciences*, 16(2):206-215.
21. Chaouat G, Ledee-Betaille N, Dubanchet S, Zourbas S, Sandra O, Martal J. 2004. TH1/TH2 paradigm in pregnancy: paradigm lost? Cytokines in pregnancy early abortion: reexamining the TH1/TH2 paradigm. *Int Arch Allergy Immunol.*: 134: 93-119.
22. Chaouat, G. 2007. The Th1/Th2 paradigm: still important in pregnancy? *Seminars in Immunopathology*.
23. Chen SH, Kramer MF, Schaffer PA, Coen BM. 1997. A viral function represses accumulation of transcripts from productive-cycle genes in mouse ganglia latently infected with herpes simplex virus. *J. Virol.* 71: 5878-5884.
24. Cigliano MM & Morrone JJ. 2000. Cladistic methods to analyze adaptation. *Folia Entomologica Mexicana.* 110:113-124.

25. Cobo ER, Campero CM, Gimeno EJ, Barbeito CG. 2004. Lectin binding and immunohistochemical antigen detection in genitalia of *Trichomonas foetus*-infected heifers. *J Comp Pathol.* 131:127-134.
26. Colle CF, Tarbet EB, Grafton WD, Jennings SR, O' Callaghan DJ. 1996. Equine herpesvirus-1 strain KyA, a candidate vaccine strain, reduces viral titers in mice challenged with pathogenic strain, RaCL. *Virus Res.* 43: 111-124.
27. Crabb BS & Studdert MJ. 1995. Equine herpesviruses 4 (equine rhinopneumonitis virus) and 1 (equine abortion virus). *Adv. Virus. Res.* 45: 153-190.
28. Croy AB, van den Heuvel MJ, Borzychowski AM, Tayade C. 2006. Uterine natural killers cells: a specialized differentiation regulated by ovarian hormones. *Imm Rev.* 214. 161-185.
29. Csellner H, Whalley JM, Love DN. 1995. Equine Herpesvirus 1 (HUS25A) isolated from an aborted foetus produces disease in BALB/C mice. *Aust. Vet. J.* 72: 68-69.
30. Cunningham CH. *Virología Práctica.* Editorial Acribia. Zaragoza. España. 1971.
31. Davison AJ. 2002. Evolution of the herpesvirus. *Vet Microbiol* 86 (1-2): 69-88.
32. Del Médico Zajac. 2007. Herpesvirus Bovino 5: Estudio de la infección, la respuesta inmune y los recombinantes con Herpesvirus Bovino 1 en el hospedador natural. Trabajo de Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
33. De Queiroz K & Poe S. 2001. Philosophy and phylogenetic inference. A comparison of Likelihood and Parsimony methods in the context of Karl Popper's Writings on corroboration. *Systematic Biology.* 50: 305-321.
34. Deshmane SL & Fraser NW. 1989. During latency, herpes simplex virus type 1 DNA is associated with nucleosomes in a chromatin structure. *J. Virol.* 63: 943-947.
35. Doerig C, Pizer LI, & Wilcox CL. 1991. An antigen encoded by the latency-associated transcript in neuronal cell cultures latently infected with herpes simplex virus type 1. *J. Virol.* 65 (5): 2724-2727.
36. Doll ER, Bryans JJ. 1963. Incubation periods for abortion in equine viral rhinopneumonitis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 141: 351-354.
37. Dutta SK, Myrup A, Bumgardner MK. 1980. Lymphocyte responses to virus and mitogen in ponies during experimental infection with equine herpesvirus 1. *Am J. Vet. Res.* 41: 2066-2068.

38. Edington N, Bridges CG, Patel JR. 1986. Endothelial cell infection and thrombosis in paralysis caused by equid herpesvirus 1: equine stroke. *Arch. Virol.* 90: 111-124.
39. Eldredge N & Cracraft J. 1980. *Phylogenetic patterns and the evolutionary process.* Columbia Univ. Press, New York.
40. Etcheverrigaray ME, Oliva GA, Gonzalez ET, Nosetto EO & Martin AA. 1982. Comportamiento de una cepa de HVE-1 aislada de un feto abortado. *Rev Mil Vet.* 30: 138-139.
41. Farris JS. 1969. A successive approximation approach to character weighting. *Systematic Zoology.* 18:374-385.
42. Farris JS. 1970. Methods for computing Wagner trees. *Systematic Zoology.* 19: 83-92.
43. Farris JS. 1977. Phylogenetic analysis under Dollo's law. *Systematic Zoology.* 26: 77-88.
44. Farris JS. 1981. Distance data in phylogenetic analysis. pp.1-22. En: Funk, V & D.R... Brooks (eds.) *Advances in Cladistics. Proceedings of the first Meeting of the Willi Hennig Society, New York, Botanical Garden, New York.*
45. Farris JS. 1982. Simplicity and informativeness in systematic and phylogeny. *Systematic Zoology* 31:413-444.
46. Felsenstein J. 1978. Cases in which parsimony or compatible methods will be positively misleading. *Systematic Zoology* 27: 27-33.
47. Felsenstein J. 1981. Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *Journal of Molecular Evolution,* 17: 368-376.
48. Felsenstein J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783-791.
49. Field HJ, Awan AR, de la Fuente R. 1992. Reinfection and reactivation of equine herpesvirusv -1 in the mouse. *Arch. Virol.* 123: 409- 419.
50. Filatov DA. 2002. Proseq: A software for preparation and evolutionary analysis of DNA sequence data set. *Molec. Ecology Notes,* 2: 621-624.
51. Fitch WM. 1971. Toward defining the course of evolution: Minimal Change for a specific tree topology. *Systematics Zoology* 20: 406-416.
52. Flint SJ, Enquist LW, Racaniello VR, Skalca AM. Structure, genome organization, and infectious cycles. En: *Principles of virology.* 2° ed. Washington DC. USA: ASM Prees 2004. pp. 811-812

53. Forey PL, Humphries CL, Kitching IJ, Scotland RW, Siebert DJ & Williams DM. 1992. *Cladistics: a practical course in systematic*. Clarendon Press, Oxford.
54. Frampton AR, Smith PM, Zhang Y, Grafton WD, Matsumura T, Osterrieder N, O'Callaghan DJ. 2004. Meningoencephalitis in mice infected with an equine herpesvirus 1 strain KyA recombinant expressing glycoprotein I and glycoprotein E. *Virus Genes* 29 (9): 9-17.
55. Friedman HM, Cohen GH, Eisenberg RJ, Seidel CA, & Cines DB. 1984. Glycoprotein C of herpes simplex virus 1 acts as a receptor for the C3b complement component on infected cells. *Nature* 309 (5969): 633-635.
56. Fries LF, Friedman HM, Cohen GH, Eisenberg RJ, Hammer CH & Frank MM. 1986. Glycoprotein C of herpes simplex virus 1 as inhibitor of the complement cascade. *J. Immunol* 137 (5): 1636-1641.
57. Galosi CM, Nosetto EO, Gimeno EJ, Gomez Dunn C, Etcheverrigaray ME, Ando Y. 1989. Equine Herpesvirus-1 (EHV-1): Characterisation of a viral strain isolated from equine plasma in Argentina. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epizz.* Vol 8 (1): 117-122.
58. Galosi CM, Norimine J, Echeverría MG, Oliva GA, Nosetto EO, Etcheverrigaray ME, Tohya Y, Mikami T. 1998a. Diversity of genomic electropherotypes of naturally occurring Equine Herpesvirus 1 isolates in Argentina. *Braz J Med Biol Res.* 31(6): 771-774.
59. Galosi CM, Echeverría MG, Vila Roza MV, Cid de la Paz V, Oliva GA, Etcheverrigaray ME. 1998b. Virus herpes equino tipo 1 (EHV-1): patrones de restricción de ADN, perfiles proteicos y estudio de patogenicidad en ratones. *Analecta Veterinaria* 18, ½: 35-40.
60. Galosi CM, Vilaroza MV, Oliva GA, Pecoraro MR, Echeverría MG, Corva S, Etcheverrigaray ME. 2001. A polymerase chain reaction for detection of Equine herpesvirus- 1 in routine diagnostic submissions of tissues from aborted fetuses. *J. Vet. Med B* 48: 341-346.
61. Galosi CM, Barbeito CG, Vila Roza MV, Cid de la Paz V, Ayala MA, Corva S, Etcheverrigaray ME, Gimeno EJ. 2004. Argentine strain of equine herpesvirus 1 isolated from an aborted foetus low virulence in mouse respiratory and abortion model. *Vet. Microbiol.* 103: 1-12.
62. Galosi CM, Barbeito CG, Martín Ocampos GP, Martínez JP, Ayala M, Corva S, Etcheverrigaray ME; Gimeno EJ. 2006. An Argentine Equine Herpesvirus Strain with

Special Restriction Patterns Protect Mice Challenged with a Pathogenic Strain. *J. Med. Vet B.* 53: 412-417

63. Garber DA, Beverley SM & Cohen DM. 1993. Demonstration of circularization of herpes simplex virus DNA following infection using pulsed field gel electrophoresis. *Virology* 197(1): 459-462.

64. Gardfield RE, Bytautiene E, Vedernikov YP, Marshall JS, Romero R. 2000. Modulation of rat uterine contractility by mast cells and their mediators. *Am J Obstet Gynecol*, 183: 118-125.

65. Gojobori T, Ishii K, Nei M. 1982. Estimation of average number of nucleotide substitutions when the rate of substitution varies with nucleotide. *J Mol Evol.* 18. 414-423.

66. Goloboff P. 1998. *Principios básicos de Cladística*. Sociedad Argentina de botánica, Bs As.

67. Goloboff P, Nixon K and Farris J. 2003. (TNT) Tree Analysis using New Technology. Published by the authors, Tucumán, Argentina.

68. Gostzonyl G, Borchers K, Ludwig H. 2009. Pathogenesis of equine herpesvirus-infection in the mouse model. *J. Virol.* 82 (21): 10820-10831.

69. Hall TA. 1999. Bioedit: a user- friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41: 95-98.

70. Hasewaga M, Kishino H, Yano T. 1985. Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. *J Mol Evol.* 22: 160-174.

71. Hendy MD & Penny D. 1982. Branch and bound algorithms to determinate minimal evolutionary trees. *Mathematical Biosciences.* 59: 271-290.

72. Hennig W. 1966. *Elementos de una Sistemática filogenética*. EUDEBA, Bs As.

73. Hillis DM and Bull JJ. 1993. An empirical test of bootstrapping as a method for assessing confidence in phylogenetic analysis. *Systematic Biology.* 44:3-16.

74. Huemer HP, Larcher C, & Coe NE. 1992. Pseudorabies virus glycoprotein III derived from virions and infected cells binds to the third component of complement. *Virus Res* 23 (3): 271-280.

75. Huemer HP, Larcher C, van Drunen Littel-van der Hurk S, & Babiuk LA. 1993. Species selective interaction of Alphaherpesvirinae with the "unspecific" immune of the host. *Arch Virol* 130 (3-4): 353-364.

76. Huemer HP, Nowonty N, Crabb BS, Meyer H & Hubert PH. 1995. gp 13 (EHV-gC): a complement receptor induced by equine herpesvirus. *Virus Res* 37(2): 113-126.

77. Hung SL, Peng C, Kostavasili I, Friedman HM, Lambris JD, Eisenberg RJ & Cohen GH. 1994. The interaction of glycoprotein C of herpesvirus simplex types 1 and 2 with the alternative complement pathway. *Virology*. 203 (2): 299-312.
78. Ibrahim el SM, Pagmajav O, Yamaguchi T, Matsumura T, Fukushi H. 2004. Growth and virulence alterations of equine herpesvirus 1 by insertion of a green fluorescent protein gene in the intergenic region between ORF 62 and ORF 63. *Microbiol Immunol*. 48 (11): 831-842.
79. Imman M, Perng GC, Henderson G, Ghiasi H, Nesburn AB, Weschler SL & Jones, C. 2001. Region of herpes simplex type 1 latency –associated transcript sufficient for wild-type spontaneous reactivation promotes cell survival in tissue culture. *J. Virol* 75 (8): 3636-3646.
80. Inazu M, Tsuchi O, Kirisawa R, Kawakami Y, Iwai H. 1993. Equid herpesvirus 1 infection in mice. *J. Vet. Med. Sci* 55, 119- 121.
81. Iwai H, Kodera A, Sekiya N, Nakamura A, Kirisawa R. 1998. Effect of Equid herpesvirus 1 infection on parturition of mice. *J. Equine vet Sci*. 9, 25-27.
82. Jackson TA, Osburn BI, Kendrick JW. 1977. Equine herpesvirus 1 infection in horses: studies on the experimentally induced neurologic disease. *Am. J. Vet. Res.* 38: 709-719.
83. Jones C. 2003. Herpes Simplex Virus Type 1 and Bovine Herpesvirus 1 Latency. *Clin Microbiol Rev.* 76 (1): 76-79.
84. Jones C, Geiser V, Henderson G, Jiang Y, Meyer F, Perez S & Zhang Y. 2006. Functional analysis of bovine herpesvirus 1 (BHV-1) genes expressed during latency. *Vet Microbiol*. 113 (3-4): 199-210.
85. Jones L. 2002. Estudios moleculares y evolutivos del género *Pestivirus*. Trabajo de Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Naturales y Museo. (UNLP).
86. Jones LR, Cigliano MM & Weber EL. 2004 Phylogenetic analysis of bovine pestiviruses: testing the evolution of clinical symptoms. *Cladistics*. 20: 443-453.
87. Jukes TH & Cantor CR. 1969. Evolution of protein molecules. En *Mammalian Protein Metabolism III* (HN Munro, editor), pp: 21-132. Academic Press, New York.
88. Källersjö M, Albert VA & Farris JS. 1999. Homoplasy increases phylogenetic structure. *Cladistics*. 15: 91-93.
89. Karimi K, Blois SM, Arck PC. 2008. The upside of natural killers. *Nature Medicine*, 14(11): 1184-1185.

90. Kimura M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* 16: 111-120.
91. Kimura M. 1981. Estimation of evolutionary distances between homologous nucleotide sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78: 454-458.
92. Kirisawa R, UI S, Takahashi A, Kawakami Y & Iwai H. 1994. Comparison of the genomes of attenuated equine herpesvirus 1 strains with their parent virulent strains. *Virology*. 200: 651-660.
93. Kitching IJ, Forey PL, Humphries CJ & Williams DM. 1998. *Cladistics. The theory and practice of parsimony analysis. Second Edition. The Systematics Association Publication N° 11. Oxford University Press Inc., New York.*
94. Kluge AG. 1984. The relevance of parsimony to phylogenetic inference. En Duncan T. & F. Stuessy (Eds.). *Perspectives on the reconstruction of evolutionary history. Columbia Univ. Press, New York.*
95. Koga K, Cardenas I, Aldo P, Abrahams U, Peng B, Fill S, Romero, R, Mor G. 2009. *Am J Rep Immunol.* 6: 196-212.
96. Krummenacher C, Zabolotny JM, Fraser NW. 1997. Selection of nonconsensus branch points is influenced by an RNA stem-loop structure and is important to confer stability to herpes simplex virus 2-kilobase latency associated transcript. *J Virol.* 71: 5849-5860.
97. Kukreja A, Walker C, Fitzmaurice T, Awan A, Love DN, Whalley JM, Field HJ. 1998. Protective effects of equine herpesvirus 1 (EHV-1) glycoprotein B in a murine model of EHV-1 induced abortion. *Vet. Microbiol.* 62: 303-311.
98. Kydd JH, Smith KC, Hannant D, Livesay GJ, Mumford JA. 1994. Distribution of Equid Herpesvirus-1 (EHV-1) in the respiratory tract ponies-implications for vaccination strategies. *Equine Vet J.* 26: 466-469.
99. Lanteri AA, Cigliano MM, Margaría C. (Cap 10). 2006. Análisis filogenético de datos moleculares. Congruencia taxonómica. Soporte y confianza estadística de grupos y árboles. pp: 157-159. En: Lanteri, AA y Cigliano, MM (Eds.). *Sistemática Biológica: fundamentos teóricos y ejercitaciones Editorial Edulp, Bs As, Argentina.*
100. Lanyon S. 1985. Detecting internal inconsistencies in distance data. *Systematic Zoology.* 34: 397-403.

101. Maggioncalda J, Mehta A, Su YH, Fraser NW & Black M.1996. Correlation between herpes simplex virus type 1 rate reactivation from latent infection and the number of infected neurons in trigeminal ganglia. *Virology*: 2257-2281.
102. Marquez Rosa de Jesús. 1997. Tesis Doctoral “Determinación de la cultura sobre el uso de animales de laboratorio existentes en los investigadores de la Universidad de los Andes” Mérida. Venezuela. Universidad de los Andes.Facultad de Ciencias. Departamento de Biología.
103. Martinez JP, Martín Ocampos GP, Fernández LC, Fuentealba NA, Cid de la Paz V, Barrandeguy M & Galosi CM. 2006. First detection of equine herpesvirus genome 1B in Argentina. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 25(3): 1075-1079.
104. Martín Ocampos GP, Fuentealba NA, Sguazza GH, Jones LR, Cigliano MM, Barbeito CG, Galosi CM. 2009. Genomic and phylogenetic analysis of Argentinian Equid Herpesvirus 1 strains. *Virus Genes* 38 (1): 113-117.
105. Martoja R, Martoja M. 1970. *Técnicas de Histología Animal*. Ed. Toray-Masson.SA. Barcelona.
106. Marshall KR, Field HJ, 1997. Demonstration of equine herpesvirus -1 neuronal latency in murine olfactory bulbs using a novel combined in situ PCR and protein synthesis method. *Virology*. 229:279-282.
107. Mayr E & Ashlock PD.1991. *Principles of Systematics Zoology*. Mc Graw-Hill, Inc., New York.
108. Mc Culloch J, Williamson SA, Powis SJ, Edington N. 1993. The effect of the eHV-1 infection upon circulating leucocyte populations in the natural equine host. *Vet Microbiol.* 37: 147-161.
109. Mc Geoch D.J. & Cook S. 1994. Molecular Phylogeny of the Alphaherpesvirinae subfamily and proposed evolutionary timescale. *J Molec Biol.* 238, 9-22.
110. Mettenleiter TC. 2002. Herpesvirus assembly and egress. *J. Virol.* 76 (4): 1537-1547.
111. Meyer H, Hubert PH, Schwend C & Eichmon W. 1992. Rapid identification and differentiation of the vaccine strain RacH from EHV-1 field isolates using a non-radioactive DNA probe. *Vet Microbiol.* 30: 13-20.
112. Mor G & Abrahams. 2003. Potential role of macrophages as immunoregulators of pregnancy. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 2, 1:119.
113. Muiykens B, Meurens F, Schynts F & Thiry E. 2003. Les facteurs de virulence des alphaherpèsvirus. *Virologie.* 7: 401-415.

114. Nagashunmugan T, Lubinski J, Wang L, Goldstein LT, Weeks BS, Sundaresan P, Kang EH, Dubin G & Friedman HM. 1998. In vivo immune evasion mediated by the herpes simplex virus type 1 immunoglobulin G Fc receptor. *J Virol*. 72(7): 5351-5359.
115. Nandakumar S, Woolard SN, Yuan D, Rouse BT & Kumaguru. Natural killers cells as novel helpers in Anti-Herpes Simplex virus immune response. *J Virol* 82 (21): 10820-10831
116. Nicholas KB, Nicholas HB, & Deerfield D.W. 1997. Genedoc: Analysis of Genetic Variation. *EMBNEW NEWS* 4:14.
117. Nixon KC. 1999. The parsimony ratchet, a new method for rapid parsimony analysis. *Cladistics* 15(4): 407-414.
118. Nixon KC. 2002. Winclada, v1.00.08. Published by the author, Ithaca, NY.
119. Norberg P, Bergstrom E, Rekadbar E, Lindh M & Liljeqvist JA. 2004. Phylogenetic analysis of clinical Herpes Simplex Virus Type 1 identification of genetic groups and recombinant viruses. *J Virol* 78 (19): 1075-1079.
120. Nugent J, Birch-Machin I, Smith KC, Mumford JA, Swann Z, Newton JR, Bowden RJ, Allen GP, Davis-Poynter N. 2006. Analysis of equid herpesvirus strain variation reveals a point mutation of the DNA polymerase strongly associated with neuropathogenic versus non- neuropathogenic disease outbreak. *J Virol*. 80,4047-4060.
121. Ostlund PN, Powell D, Bryans JT. 1991. Equine herpesvirus 1: a review. *Progress in American Association of Equine Practitioners* 36: 387-395.
122. Pagamjav O, Sakata T, Matsumura T, Yamaguchi T, Fukushi H. 2005. Natural Recombinant between Equine Herpesvirus 1 and 4 in the ICP 4 Gene. *Microbiol Immunol*. 49 (2): 167-179.
123. Page RDM & Holmes S.1998. *Molecular Evolution. A phylogenetic approach.* Blackwell Science.
124. Paillot R, Daly JM, Luce R, Montesso F, Davis-Poynter N, Hannant D, Kydd JH. 2007. Frequency and phenotype of EHV-1 specific, IFN-g synthesising lymphocytes in ponies: The effects of age, pregnancy and infection. *Dev Comp Immun*, 31: 207-214.
125. Palfi V & Christensen LS. 1995. Analysis of restriction fragment patterns (RFPs) and pathogenicity in baby mice of equine herpesvirus 1 and 4 (EHV-1 and EHV-4) strains circulating in Danish horses. *Vet Microbiol*. 47: 199-204.
126. Parr EL, Parr MB, Zheng LM, & Ding-E-Young E. 1991. Mouse granulated metrial glands cells originate by local activation of uterine natural killer lymphocytes 1. *Biol Reprod*. 44: 834-841.

127. Patel JR, Edington N. 1983. The pathogenicity in mice of respiratory, abortion and paresis isolates of equine herpesvirus- 1. *Vet Microbiol.* 8: 301-305.
128. Perng GC, Jones C, Ciacci-Zanella J, Stone M, Henderson G, Yukht A, Slanina SM, Hoffman FM, Ghiasi H, Nesburn AB, & Wechsler S. 2000. Virus- induced neuronal apoptosis blocked by the herpes simplex virus latency associated transcript (LAT). *Science* 287, 1500-1503.
129. Popper KR. 1983. *Conjeturas y refutaciones. El desarrollo del conocimiento científico, Paidós Studio básica. Ed. Paidós, Barcelona.*
130. Popper KR. 1985. *La lógica de la investigación científica. Ed. Tecnos, Madrid.*
131. Posada D & Crandall KA. 1998. MODELTEST: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics.* 14: 817-818.
132. Posada D, & Crandall KA. 2001, Selecting models of nucleotide substitution: An application to Human Immunodeficiency Virus 1 (HIV-1). *Mol Biol Evol.* 18: 897-906.
133. Prickett ME. 1969. The untoward reaction of the horse in injection of antigenic substances. *Am Vet Med Assoc.* 155 (2): 258-62.
134. Pride DT. 2000. SWAAP: a tool for analyzing substitutions and similarity in multiple alignments. Distributed by the author.
135. Rappocciolo G, Birch J, Ellis SA. 2003. Down-regulation of MHC class I expression by equine herpesvirus-1. *J Gen Virol* 84: 293-300.
136. Rock DL & Fraser NW. 1983. Detection of HSV-1 genoma in central nervous system of latently infected mice. *Nature.*302 (5908): 523-525.
137. Rock DL & Fraser NW. 1985. Latent herpes simplex virus type 1 contains two copies of the virion DNA joint region. *J Virol.* 55(3): 849-852.
138. Rodriguez F, Oliver JL, Martin A & Medina JR. 1990. The general stochastic model of nucleotide substitution. *J TheorBiol.* 142: 485-501.
139. Roizman B and Batterson W. 1985. Herpesviruses and their replication. En *Virology*, Field, B.N. (Eds), Raven Press, New York, USA, pp 497-526.
140. Roizman B, Desrosiers RC, Fleckenstein B, Lopez C, Minson AC & Studdert MJ. 1992. The family herpeviridae: an update. *Arch. Virol.* 123: 425-449.
141. Rosbottom A, Gibney EH, Guy CS, Kipar A, Smith RF, Kaiser P, Trees AJ, Williams DJ. 2008. Upregulation of cytokines is detected in the placentas of cattle infected with *Neospora caninum* and is more marked early in gestation when fetal death is observed. *Inf Immun.*, 76(6): 2352-2361.

142. Saito S. 2000. Cytokine network at the fetomaternal interface. *J Reprod Immunol.* 47: 87-103.
143. Saitou N & Nei M. 1987. The Neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol.* 4: 406-425.
144. Schuch RT. 2000. *Biological systematic principles and applications.* Cornell University Press, Ithaca, USA.
145. Sankoff D. 1975. Minimal mutation trees of sequences. *SIAM J App Math.* 28:35-42.
146. Shukla D, Del Canto MC, Rowe CL & Spear PG. 2000. Striking similarity of murine nectin-1 alpha to human nectin-1 alpha (HveC) in sequence and activity as a glycoprotein D receptor for alphaherpesvirus entry. *J Virol* 70 (5): 11773-11781.
147. Smith KC, Whitwell KE, Binns MM, Dolby CA, Hannant D, Mumford JA. 1992. Abortion of virologically negative fetuses following experimental challenge of pregnant pony mares with Equid Herpesvirus 1. *Eq Vet J.* 25:36-40.
148. Smith KC, Whitwell KE, Mumford JA, Gowen SM, Hannant D, Tearle JP. 1993. An immunohistological study of the uterus of mares following experimental infection by Equid Herpesvirus 1. *Eq Vet J* 24: 256-259.
149. Smith KC, Mumford JA, Lakhani K. 1996. A comparison of equid herpesvirus-1 (EHV-1) vascular lesions in the early versus late pregnant equine uterus. *J Comp Path* 114, 231-247.
150. Smith KC. 1997. Herpesviral abortion in domestic animals. Review. *Vet J* 153: 253-268.
151. Smith KC, Borchers K. 2001. A study of the pathogenesis of equid herpesvirus-1 (EHV-1) abortion by DNA in-situ hybridization. *J Comp Path* 125: 304-310.
152. Som A. 2006. Theoretical foundation to estimate the relative efficiencies of the Jukes-Cantor+ gamma model and the Jukes-Cantor model in obtaining the correct phylogenetic tree. *Gene:* 103-110.
153. Spear PG, Eisenberg RJ & Cohen GH. 2000. Three classes of cell surface receptors for alphaherpesvirus entry. *Virology* 275 (1): 1-8.
154. Spear PG & Longnecker R. 2003. Herpesvirus entry: an update. *J Virol* 77 (19): 10179-10185.
155. Studdert MJ, Simpson T, & Roizman B. 1981. Differentiation of respiratory and abortigenic isolates of equine herpesvirus 1 by restriction endonucleases. *Science.* 214: 562-564.

156. Swofford DL & GJ Olsen. 1990. Phylogeny reconstruction. pp.411-501. En Hillis, DM & C Moritz (Eds.). *Molecular Systematic*. Sinauer, Sunderland.
157. Swofford D.L, Olsen GJ, Wadell PJ & Hillis. 1996. Phylogenetic inference. En Hillis, DM, Moriz, C, & Mable, BK, *Molecular Systematic*. Second Edition. Editorial Sinauer Associates, Sunderland, USA.
158. Swofford DL.1998. PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (* and other methods). Version 4. Ed.Sinauer Associates, Sunderland, USA.
159. Takahata N, Kimura M. 1981. A model of evolutionary base substitutions and its application with special reference to rapid change of pseudogenes. *Genetics* 98(3): 641-657.
160. Tearle JP, Smith KC, Boyle MS, Binns MM, Livesay GJ, Mumford JA. 1996. Replication of equid herpesvirus 1 (EHV-1) in the testes and epididymes of ponies and venereal shedding of infection virus. *J Comp Path.* 115: 385-397.
161. Telford ER, Watson MS, McBride K, & Davison S. 1992. The DNA sequence of Equine Herpesvirus 1. *Virology* 189: 304-316.
162. Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F & Higgins DG. 1997. The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 25: 4876-4882.
163. Thompson RL, Sawtell NM. 1997. The herpes simplex virus type 1 latency-associated transcript gene regulates the establishment of latency. *J Virol.*71(7): 5432-5440.
164. Van de Walle GR, Peters ST, Vanderven BC, O'Callaghan DJ, Osterrieder N. 2008. Equine Herpesvirus entry via endocytosis is facilitated by integrins and an RSD motif glycoprotein D. *J Virol.* 82(23): 11859-11868.
165. Van Woensel PAM, Goovaerts D, Markx N, Viser N. 1995. A mouse model for testing the pathogenicity of equine herpesvirus – 1 strain. *J Virol Methods* 54: 39-49.
166. Vissani MA, Miño S, Becerra L, Tordoya MS, Olguin Periglione C, Barrandeguy M. 2008. Identificación del biotipo neuropatogénico de Herpes virus equino en fetos abortados en la República Argentina. *Rev Arg Microbiol.*40 (1): 98.
167. Vogel FS, Caron L, Flores EF, Weiblen R, Winkelmann ER, Maye, SV & Bastos RG. 2003. Distribution of bovine herpesvirus type 5 DNA in the central nervous systems of latently, experimentally infected calves. *J Clin Microbiol.* 41 (10): 4512-4520.

168. Vossen MT, Westerhout EM, Soderberg-Naucler C & Wiertz EJ. 2002. Viral immune evasion: a masterpiece of evolution. *Inmunogenetics* 54(8): 527-542
169. Walker C, Packiarajah P, Gilkerson JR, Love DN, Whalley JM. 1998. Primary and challenge infection of mice with equine herpesvirus 1, strain HSV25A *Virus Res* 57: 151-162
170. Walker C, Perotti VM, Love DN, Whalley JM. 1999. Infection with equine herpesvirus 1 (EHV-1) strain HVS25A in pregnant mice. *J Comp Path.* 120: 15-27.
171. Wegmman TG, Hui Lin LG, Mosmann TR. 1993. Bidirectional cytokine interactions in the maternal- fetal relationship: is successful pregnancy a T H2 phenomenon? *Inmunology Today.* 14: 353-356.
172. Whitbeck JC, Knapp AC, Enquist LW, Lawrence WC. 1996. Synthesis, processing, and oligomerization of bovine herpesvirus 1 gE and gI membrane proteins. *J Virol* 70(11): 7878-7884.
173. Whitwell KE & Blunden AS. 1992. Pathological findings in horses dying during an outbreak of the paralytic form of Equid Herpesvirus type 1 (EHV-1) infection. *Eq Vet J.* 24: 13-19.
174. Wiley EO. 1981. *Phylogenetics: The theory and practice of systematic phylogenetic.* John Wiley & Sons, New York.
175. Yang Z, Goldman N & Friday A. 1994. Comparison of models of nucleotide substitution used in maximum likelihood phylogenetic estimation. *Mol Biol Evol.* 11: 316-324.
176. Ye GJ, Vaughan KT, Vallee RB & Roizman B. 2000. The herpes simplex virus 1 U (L) 34 protein interacts with a cytoplasmic dynein intermediate chain and targets nuclear membranes. *J Virol* 74 (3): 1355-1363.
177. Zhang Y, Smith PM, Jennings SR, O' Callaghan DJ. 2000. Quantitation of virus-specific classes of antibodies following immunization of mice with attenuated equine herpesvirus 1 and viral glycoprotein D. *Virology* 268, 482-492.
178. Zhang JH, He H, Borzychowski AM, Takeda K, Akira S & Croy BA. 2003. Analysis of cytokine regulators inducing interferon production by mouse uterine natural killers. *Biol Reprod.* 68: 404-411.
179. Zenclussen AC, Schumacher A, Zenclussen ML, Wafula P & Volk, H. 2007. Immunology of pregnancy: cellular mechanisms allowing fetal survival within the maternal uterus. *Expert reviews in molecular medicine*, 9, Issue 10.

180. Zwaagstra JC, Ghiasi H, Slanina SM, Nerburn AB, Wheathley SC, Lillycrop K, Wood J, Latchman DS, Patel K & Wechsler SL. 1990. Activity of herpes simplex virus type 1 latency-associated transcript (LAT) promoter in neuron-derived cells: evidence of neuron specificity and for a large LAT transcripts. *J Virol.* 64: 5019-5028.

