



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

Identificación de secuencias de ADN relacionadas a Transcritos
Asociados a Latencia en el genoma del Herpesvirus Canino tipo 1
(CHV-1) por medio de herramientas Bioinformáticas

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

Médico Veterinario Zootecnista

P R E S E N T A:

Mario Alberto Hernández Ortíz

ASESOR:

Dr. Guillermo Valdivia Anda



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES**

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

**M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN
PRESENTE**

**ATN: LA. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Exámenes Profesionales
de la FES Cuautitlán.**

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis

Identificación de secuencias de ADN relacionadas a Transcritos Asociados a Lactancia en el genoma del Herpesvirus Canino tipo 1 (CHV-1) por medio de herramientas Bioinformáticas

Que presenta el pasante: MARIO ALBERTO HERNÁNDEZ ORTÍZ
Con número de cuenta: 41206366-4 para obtener el Título de la carrera: Medicina Veterinaria y Zootecnia

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 05 de octubre de 2017.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dr. Humberto Alejandro Martínez Rodríguez	
VOCAL	Dr. Miguel Angel Cornejo Cortés	
SECRETARIO	Dr. Guillermo Valdivia Anda	
1er. SUPLENTE	M. en C. Alejandro Vargas Ruíz	
2do. SUPLENTE	Dr. Jesús Jonathan Ramírez Espinosa	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

LMCF/ntm*

El presente trabajo se realizó con el apoyo de los Proyectos:

PAPIIT IT-202114 “Evaluación de la enfermedad de herpesvirus canino en México y Desarrollo de posibles medidas para su control y prevención”

y

PAPIIT IT201218 “Desarrollo de un modelo en cultivos celulares para estudiar la latencia de Herpesvirus Canino”

DEDICATORIA

A mi familia, a quienes le debo todo y sin cuyo apoyo, aliento, y confianza no hubiera llegado tan lejos.

A Adriana, la joven Piu, que evitó que me perdiera en el abismo y quien guió mis pasos aún en contra de mi propia mediocridad.

A las bestias peludas, por quienes me inicié en este viaje, y aunque al final las cosas no sucedieron como las imaginé, el camino recorrido me enseñó hacia donde he de dirigir mis pasos.

Gracias por todo.

“There are naive questions, tedious questions, ill-phrased questions, questions put after inadequate self-criticism. But every question is a cry to understand the world. There is no such thing as a dumb question.”

— Carl Sagan

Lista de Virus mencionados	
AIHV-1	Herpesvirus de Alceláfidos 1
AnHV-1	Herpesvirus de Anatidos 1
BoHV-1,5	Herpesvirus Bovino 1,5
BLV	Virus de la Leucemia Bovina
CHV-1	Herpesvirus Canino 1
CpHV-1	Herpesvirus Caprino 1
EHV-1,2,3,4	Herpesvirus Equino 1,2,3,4
EEHV-1	Herpesvirus Endoteliotrópico de Elefantes 1
FeHV-1	Herpesvirus Felino 1
GaHV-1,2,3	Herpesvirus Aviar 1,2,3
HHV-5,6,7,8	Herpesvirus Humano 5,6,7,8
HSV-1,2	Herpesvirus Simplex 1,2
HVS	Herpesvirus Saimiri
MHV68	Gammaherpesvirus de ratón 68
McHV-5	Herpesvirus de Macaco 5
MeHV-1	Herpesvirus de Pavo 1
MuHV-1,2,4	Herpesvirus de ratón 1,2,4
OvHV-1	Herpesvirus Ovino 1,2,4
PhHV-1	Herpesvirus de Fócidos
PsHV-1	Herpesvirus de Psitácidos 1
SuHV-1	Herpesvirus Porcino 1
VZV	Virus de Varicella Zóster

Contenido

1. INTRODUCCIÓN	7
1.1 HERPESVIRUS CANINO TIPO 1	7
1.1. 1. Generalidades	7
1.1. 2. Clasificación	8
1.1. 3. Características Morfológicas Generales	9
1.1.4. Generalidades de Replicación Viral	11
1.1.5. Latencia	13
1.2. BIOINFORMÁTICA	17
2. ANTECEDENTES	18
3. JUSTIFICACIÓN	19
4. HIPOTESIS	19
5. OBJETIVO GENERAL	19
6. OBJETIVOS PARTICULARES	19
7. METODOLOGÍA	20
I. Comparación de la similitud de los genes RL2 y RS1 del CHV-1 con sus homólogos y con los genes LAT identificado en otros Herpesvirus	20
II. Identificación y análisis de microARNs derivados de la posible localización del gen LAT en CHV-1	24
III. Identificación de posibles productos derivados del gen LAT del CHV-1	28
8. RESULTADOS	30
I. Comparación de la similitud en la región génica relacionada con la latencia en los Herpesvirus	30
II. Identificación de microARNs derivados de la posible localización de gen LAT en CHV-1	33
III. Identificación de posibles productos derivados del gen LAT del CHV-1	39
9. DISCUSIÓN	43
I. Comparación de la similitud en la región génica relacionada con la Latencia en los Herpesvirus	43
II. Identificación de microARNs derivados de la localización putativa del gen LAT en CHV-1	46
III. Identificación de posibles productos derivados del gen LAT putativo del CHV-1	48
10. CONCLUSIONES	50
11. PERSPECTIVAS	50
12. BIBLIOGRAFIA	51
13. ANEXOS	61

1. INTRODUCCIÓN

1.1 HERPESVIRUS CANINO TIPO 1

1.1. 1. Generalidades

Los Herpesvirus son una familia viral que comparten características morfológicas, genéticas y patogénicas entre sí y que se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza ya que se han identificado aproximadamente 200 virus distintos en peces, reptiles, anfibios, moluscos, aves y mamíferos (Norkin, 2010). Los Herpesvirus generalmente afectan a unas pocas especies debido a que estos agentes etiológicos coevolucionaron con sus hospederos durante largo tiempo y por ello han alcanzado un elevado nivel de adaptación por lo que, con algunas notables excepciones, las infecciones por herpesvirus suelen ser inaparentes o subclínicas y solo son severas en animales neonatos e inmunosuprimidos (MacLachlan & Dubovi, 2011; Quinn *et al.*, 2011).

Aunque varían en el rango de hospederos, tamaño del genoma y composición molecular todos los Herpesvirus comparten características biológicas y poseen una estructura común en el virión (Figura 1.1): núcleo de ADN de doble cadena (dsDNA), cápside icosaédrica, tegumento proteico y envoltura derivada de la membrana celular, compuesta de poliaminas, lípidos y glicoproteínas (Porterfield, 1989; Whitley, 1996; Cheng & Miyamura, 2008).

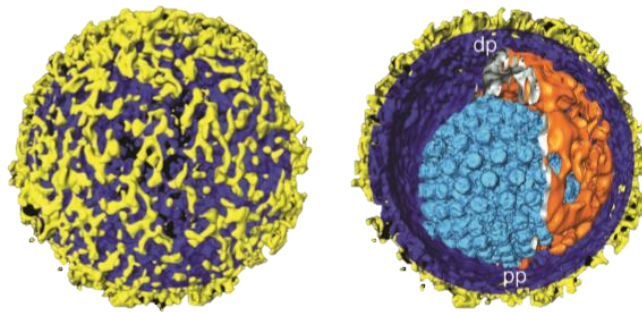


Figura 1.1. Reconstrucción de un virión del Herpes Simplex Virus. Izq.: Superficie externa en donde se muestra la envoltura (azul) y las glicoproteínas (amarillo). Der.: Corte transversal que muestra el interior del virión. Se observan la cápside (azul claro) y el tegumento (naranja) dentro de la envoltura (amarillo y azul oscuro). Dp, Polo distal; pp, polo proximal. (Tomado de Grünewald *et al.*, 2003).

1.1. 2. Clasificación

El orden *Herpesvirales* agrupa tres familias: *Herpesviridae*, que contiene los virus de mamíferos, aves y reptiles; *Alloherpesviridae*, que agrupa a los herpesvirus de peces y anfibios; y *Malacoherpesviridae*, que incluye a los herpesvirus de bivalvos (Davison *et al.*, 2009; King *et al.*, 2012). Todos los virus de humanos y de animales domésticos se encuentran englobados en la familia *Herpesviridae* (Tabla 1.1) que a su vez se divide en tres subfamilias.

Subfamilia	Género	Especies	Características
<i>Alphaherpesvirinae</i>	<i>Simplexvirus</i>	HSV-1, HSV-2, BoHV-2	-Variable rango de hospederos, -Ciclo de replicación de corta duración -Rápida diseminación en cultivos celulares -Destrucción eficiente de las células infectadas -Capacidad para establecer infecciones latentes principalmente en los ganglios sensoriales
	<i>Varicellovirus</i>	VZV, BoHV-1, BoHV-5, CpHV-1, SuHV-1, EHV-1, EHV-3, EHV-4, CHV-1, FeHV-1, PhHV-1	
	<i>Mardivirus</i>	AnHV-1, GaHV-2, GaHV-3, MeHV-1	
	<i>Iltovirus</i>	GaHV-1, PsHV-1	
<i>Betaherpesvirinae</i>	<i>Cytomegalovirus</i>	HHV-5	-Rango de hospederos muy reducido -Ciclo de replicación es largo (más de siete días), -Infección lenta de los cultivos celulares -Las células infectadas frecuentemente aumentan de tamaño (citomegalia) -Establecen infecciones latentes en glándulas secretorias, células linforeticulares, riñones y otros tejidos.
	<i>Muromegalovirus</i>	MuHV-1, MuHV-2	
	<i>Proboscivirus</i>	EIHV-1	
	<i>Roseolovirus</i>	HHV-6, HHV-7, HHV-8	
<i>Gammaherpesvirinae</i>	<i>Lymphocryptovirus</i>	HHV-4, MuHV-4	-Estrecho rango de hospederos Replicación en células linfoides y algunos pueden infectar células epiteliales y fibroblastos -La latencia se desarrolla dentro del tejido linfoblastoide. -Algunos de sus miembros están relacionados con la transformación oncogénica de los linfocitos.
	<i>Macavirus</i>	AIHV-1, OvHV-1	
	<i>Percavirus</i>	EHV-2	
	<i>Rhadinovirus</i>	McHV-5	

(Modificado de Fauquet *et al.*, 2005; Davison, 2007; MacLachlan & Dubovi, 2011).

El CHV-1 pertenece a la subfamilia *Alphaherpesvirinae*, género *Varicellovirus*. Ésta subfamilia agrupa a la mayoría de los virus de importancia humana y veterinaria, incluidos HSV-1, SuHV-1, BoHV-1 y algunos herpesvirus de carnívoros. Éste último grupo está representado dentro de la subfamilia por tres virus filogenéticamente muy relacionados: CHV-1, FeHV-1 y PhHV-1 (Gaskell & Willoughby, 1999). De éstos los más relacionados entre sí desde un punto de vista inmunológico son los virus de los carnívoros domésticos ya que

comparten antígenos que causan neutralización cruzada, y ambos virus tienen una homología de 51% en sus genomas (Rota & Maes, 1990). Se han llevado a cabo estudios serológicos entre el CHV-1 y otros virus relacionados, resultando en neutralización cruzada entre el HSV-1, HSV-2 y SuHV-1 (Manning *et al.*, 1988).

1.1.3. Características Morfológicas Generales

Ya que todos los herpesvirus comparten sus características más básicas, se ha utilizado al HSV-1 como un herpesvirus prototípico debido a la cantidad de información que se ha derivado de su estudio. El caso del CHV-1 no es la excepción y la descripción de su morfología se basará mayoritariamente en la información disponible para el HSV-1.

1.1.3. a. Genoma

Los genomas de los herpesvirus poseen secuencias repetidas de nucleótidos que pueden ser directas, la secuencia que se repite está en la misma dirección, o invertidas. Las secuencias repetidas se localizan en las Repeticiones Terminales (TR) y en las Repeticiones Internas (IR), que se localizan dentro del genoma; y cumplen varias funciones: inicio de la replicación, regulación de la transcripción, integración, transposición, segregación y empaquetado del virión (Deng *et al.*, 2012). La presencia de estas secuencias repetidas permite clasificar a los distintos genomas virales en seis tipos, designados con las letras A-F, que varían en complejidad y estructura. El CHV-1 al igual que otros *Varicellovirus* posee un genoma tipo D (Figura 1.2), que contiene una región única larga (U_L) y una región única corta (U_S), cada una flanqueada por repeticiones invertidas (TR_L/IR_L y TR_S/IR_S) (Davison, 2007a; Davison, 2008). Hasta ahora se han secuenciado las cepas 0194, V777 y V1154 del CHV-1 del Reino Unido y el tamaño promedio de su genoma es de 125 mil nucleótidos (nt) con una similitud del 99.86% entre las tres y una composición aproximada de 30% de G+C (Papageorgiou *et al.*, 2016).



Figura 1.2. Estructura del genoma de los Varicellovirus. Se muestra la disposición de las dos regiones únicas U_L y U_S (en amarillo); y las cuatro repeticiones invertidas TR_L/IR_L y TR_S/IR_S (en rojo). (Tomado de Davison, 2008).

La cantidad de genes varía entre 70 y 200 dependiendo del tipo de herpesvirus, sin embargo existe un grupo de “genes centrales” que se encuentran conservados en las subfamilias alpha, beta y gamma ya que generalmente son genes que codifican proteínas relacionadas al ingreso y replicación viral (McGeoch *et al.*, 2006).

El CHV-1 contiene 76 Marcos Abiertos de Lectura (ORFs) que codifican para el mismo número de proteínas funcionales. De éstos, 61 se localizan en la región U_L, siete en U_S y cuatro repetidas en TR_S e IR_S (Papageorgiou *et al.*, 2016)

1.1.3. b. Cápside

La cápside de todos los herpesvirus está compuesta de 12 pentones, 150 hexones y 320 triplexes, que se encuentran organizados en una estructura isométrica T=16. Cuatro proteínas principales (VP5, VP26, VP23 y VP19C) forman la estructura básica de los capsómeros (Zhou *et al.*, 2000). Los pentones se localizan en los 12 vértices del icosaedro y 11 de ellos están formados por cinco monómeros de VP5, mientras que el doceavo penton es una estructura cilíndrica llamada *Portal*, que funciona como un canal para la entrada y salida del material genético y está formada por doce monómeros del transcrito del gen UL6 (Norkin, 2010). Los hexones, por su parte, recubren las “caras” de la cápside, y están formados por seis proteínas VP5 rodeadas por un anillo de seis proteínas VP26. Los hexones tienen una geometría ligeramente distinta dependiendo de su localización y se designan como P, E o C (Steven *et al.*, 1986). En la intersección de tres capsómeros se encuentran los triplexes, que son pequeñas estructuras heterotriméricas localizadas en el piso de la cápside, formadas de dos proteínas VP26 y una VP19C que conectan a los pentones y a los hexones entre sí. Existen seis tipos de triplexes, que se conocen con la designación Ta- Tf, dependiendo de su localización (Bowman *et al.*, 2003; Zhou, & Lo, 2008; Brown & Newcomb, 2011).

1.1.3. c. Tegumento

El tegumento es la porción del virión que se encuentra entre la cápside y la envoltura. Aunque el tegumento no tiene un ordenamiento definido en la mayor parte de su estructura, en la región que está en contacto estrecho con la cápside llega a tomar una forma icosaédrica (Zhou *et al.*, 1999). Esta región está compuesta por al menos 20 proteínas distintas cuyas funciones principales son: dirigir los componentes del virión hacia y desde el núcleo durante el ingreso y el egreso, reclutar moléculas celulares que ayuden al ingreso, regular la expresión de genes virales y del huésped y ensamblar a los viriones durante el egreso (Zhou, & Lo, 2008; Kelly *et al.*, 2009). De esta manera se entiende que la función general del tegumento es llevar proteínas ya sintetizadas a las células que van a ser infectadas, para iniciar la manipulación del microambiente celular y favorecer el inicio de la replicación (Pellet & Roizman, 2013).

1.1.3. d. Envoltura

La envoltura es la capa más externa del virión. Está conformada por la membrana nuclear interna alterada de las células del hospedero, un conjunto de varias glicoproteínas de origen viral, cuyo número varía entre los diferentes herpesvirus y algunas proteínas celulares.

Las glicoproteínas forman proyecciones en forma de pincho o espícula en la superficie externa de la envoltura y se concentran alrededor del polo distal. La envoltura del CHV-1 está compuesta por las glicoproteínas B, C, D, E, G, H, I, K, L, M y N, las proteínas de membrana UL45, US8A y US9 y las proteínas de envoltura UL20 y UL43 (Papageorgiou *et al.*, 2016). De las glicoproteínas codificadas por el CHV-1, cuatro (gD, gE, gG y gI), se localizan en la región U_S (Haanes & Tomlinson, 1998) y tres (gB, gC, gH) en la región U_L (Reubel *et al.*, 2002). Estas glicoproteínas son estructuras fundamentales de la envoltura ya que llevan a cabo funciones básicas de interacción entre el virus y las células blanco. Son necesarias para el reconocimiento, unión, fusión de membranas (Choppin & Scheid, 1980), egreso y transmisión célula a célula del virión en células susceptibles (Atanasiu *et al.*, 2010).

1.1.4. Generalidades de Replicación Viral

El contacto inicial del HSV-1 con la superficie celular es a través del Sulfato de Heparan (HS) (Wudunn & Spear, 1989; Lycke, 1991; Shieh *et al.*, 1992), que al ser un glucosaminoglucano es un receptor muy accesible para la adhesión viral (Spillmann, 2001). De todas las glicoproteínas la gC es la principal responsable de la adsorción por medio del HS (Herold *et al.*, 1991). La adsorción asegura que los viriones se concentren sobre la superficie celular para aumentar la eficiencia de la infección (Campadelli-Fiume *et al.*, 2007). Estudios en otros Herpesvirus han demostrado que el HS también es la molécula primaria de unión del virus, a través de proteínas homólogas a la gB y gC del HSV-1: BoHV-1 (Byrne *et al.*, 1995); SuHV-1 (Trybala *et al.*; 1998); VZV (Jacquet *et al.*, 1998) e indirectamente, el CHV-1 (Nakamachi *et al.*, 2000). Una vez que el virión se ha unido al HS, la primera glicoproteína en intervenir en el proceso de penetración es la gD que debe interactuar con alguno de los receptores celulares (correceptores) que se han identificado hasta ahora: Mediador de Ingreso de Herpesvirus (HVEM), HVEM B, HVEM C y una versión modificada del HS (Spear *et al.*, 2000). La unión de la gD con alguno de éstos receptores modifica la conformación de la gD a una forma activa, que a su vez interacciona con el heterodímero gH/gL para regular la activación de la gB, que es la proteína que lleva a cabo la fusión (Heldwein & Krummenacher, 2008; Atanasiu *et al.*, 2010; Agelidis & Shukla, 2015).

Una vez que el virus se ha fusionado con la célula, tanto la nucleocápside como el tegumento son liberados en el citoplasma. La nucleocápside atraviesa el citoplasma con ayuda de las proteínas motoras Dineina y Dinactina, que la transportan a lo largo de los túbulos de tubulina (Döhner *et al.*, 2002; Pellet & Roizman, 2013) hasta el núcleo, en donde se une al Complejo de Poros Nucleares (NPC) a través de la Importina- β (Ojala *et al.*, 2000). Inmediatamente después, la cápside se abre e inyecta el genoma. Una vez en el núcleo el genoma viral se asocia a las estructuras nucleares ND10, como un paso previo para la expresión génica (Maul *et al.*, 1996).

Es importante mencionar que al infectar una célula, los herpesvirus suprimen la síntesis de la mayoría de las proteínas de ésta. Este proceso se lleva a cabo por la acción de dos proteínas: Vhs, una proteína del tegumento que degrada el ARNm del citoplasma y la ICP27 que suprime la transcripción de los genes celulares. Al mismo tiempo que disminuyen las proteínas celulares, el virus se apodera de sus mecanismos de síntesis para producir sus propias proteínas. (Smiley, 2004).

Los genes virales forman varios grupos dependiendo del papel que juegan en la compleja cascada de activación que conforma la replicación viral (Whitley *et al.*, 1998; Carrasco & Almendral del Río, 2006)

- Genes α ó IE (Inmediatos tempranos) se expresan inmediatamente después de que el ADN viral ingresa en el núcleo celular. Para transcribirse no necesitan de la síntesis de *ново* de proteínas y su función principal es la regulación de la expresión de otros genes.
- Genes β ó E (Tempranos), su transcripción es inducida por los genes IE y codifican proteínas que intervienen durante la replicación viral, además de suprimir la transcripción de más genes IE. La mayoría de los productos de estos genes son responsables del metabolismo de los ácidos nucleicos y son el principal blanco de la quimioterapia antiviral
- Genes γ ó L (Tardíos), se transcriben después de la replicación del ADN y codifican principalmente proteínas estructurales del virión. Se encargan de ensamblar los componentes de la cápside y del tegumento

Junto con la nucleocápside también ingresa el tegumento al citoplasma desde donde sus componentes se distribuyen de manera variable. La proteína del tegumento más importante para esta fase de la infección es VP16, que ingresa al núcleo de manera independiente a la cápside (Roizman *et al.*, 2013). Esta proteína es vital para el inicio del ciclo lítico ya que funciona como un transactivador que actúa en conjunto con las proteínas celulares Oct-1 y HCF-1 para activar la transcripción de los genes IE. De este complejo proteico depende si el virus inicia una infección lítica o si ingresa en latencia (Wysocka & Herr, 2003).

Para continuar con el ciclo de replicación el virus requiere la replicación de su genoma para que éste se empaquete en cada una de las partículas y así el virus pueda propagarse. Las proteínas E son las encargadas de preparar a la célula y llevar a cabo la replicación. Las principales proteínas involucradas son: UL41, la ADN Polimerasa y UL30, un factor que aumenta su capacidad procesamiento ; UL9, una proteína de unión al origen de replicación; UL29, la proteína ICP8, que se une al ADN de una hebra; y UL5, UL8 y UL52, que forman el complejo de Helicasa/Primasa (Boehmer & Lehman, 1997). La replicación comienza en las secuencias origen (Ori) y una vez que las proteínas E y L se han sintetizado, se forman complejos ADN-proteínas llamados sitios pre-replicativos, en asociación con las estructuras nucleares ND10. Conforme la síntesis de ADN avanza, mayores áreas del núcleo se ven involucradas y se visualizan como compartimentos globulares de replicación (Hay & Ruyechan, 2007).

Después de que se sintetizan las proteínas L éstas deben migrar desde el citoplasma hacia el núcleo, en donde se lleva a cabo el ensamblaje viral. Conforme los pentones y los hexones se unen se forma una procápside redonda (Roizman *et al.*, 2013) hacia la cual se dirige el genoma por medio del complejo de proteínas Terminasa. Al ingresar el genoma, la procápside sufre una transformación morfológica para adoptar su forma madura angulada e icosaédrica (Brown & Newcomb, 2011). Después del ensamblaje de la nucleocápside madura ésta se desplaza por medio de la actina hacia la membrana nuclear interna en donde se lleva a cabo el envolvimiento primario, que esta mediado por las proteínas internas del tegumento. En el espacio perinuclear la nucleocápside fusiona su envoltura primaria con la membrana nuclear externa a través de las glicoproteínas gB y gH/gL. Una vez en el citoplasma, los viriones adquieren las proteínas externas del tegumento, algunos ARNs y finalmente la envoltura secundaria, que se obtiene de algún organelo celular, que difiere en cada tipo de virus. Cualquiera que sea el organelo la vesícula que contiene al virión es transportada hacia la membrana plasmática y ambas se fusionan para que los viriones maduros sean liberados al espacio extracelular en donde pueden infectar otras células (Mettenleiter *et al.*, 2006; Pellet & Roizman, 2013).

1.1.5. Latencia

Una característica común a todos los herpesvirus es la capacidad de establecer una infección latente en los hospederos, durante la cual el virus se encuentra en un estado durmiente en el que disminuye en gran medida la expresión de productos virales. Sin embargo, en algunos herpesvirus se ha detectado una región transcripcionalmente activa durante la latencia y se han identificado a un conjunto de moléculas de ARN que se conocen como Transcriptos Asociados a Latencia (LATs). Estos transcriptos se han localizado en al menos siete herpesvirus, incluidos HSV-1, BoHV-1, SuHV-1, GaHV-2, AHV-1 e indirectamente en el EHV-1 y FeHV-1. Estos LATs se transcriben a partir de una sección del genoma común en todos los herpesvirus, que es en la secuencia complementaria a los genes IE y E. En el HSV-1, el gen LAT se encuentra antisentido al gen ICP0 (Farrel *et al.*, 1991), al igual que en el BoHV-1 (Jones, 2003), en el SuHV-1 el gen LAT se extiende en la secuencia complementaria a los genes ICP0 e ICP4 (Cheung, 1991), en el GaHV-2 se extiende complementario al gen ICP4 (Brown *et al.*, 2012); en EHV-1 se encuentra complementario al gen ICP0 (Baxi *et al.*, 1995) e ICP4 (Chesters *et al.*, 1997); en el FeHV-1 se localiza complementario al gen ICP4 (Townsend *et al.*, 2004)

Las funciones del LAT se han ido esclareciendo en fechas recientes, e incluyen (Kent *et al.*, 2003; Jones, 2003):

- Incremento de la supervivencia neuronal a través de la limitación de la apoptosis y de la modulación de las proteínas de la fase lítica
- Mantenimiento de la latencia al funcionar como ARNs antisentido a los genes ICP0 e ICP4

- Reactivación desde la latencia a través de la expresión de una proteína que simula la actividad de la proteína ICP0 para promover la transcripción de genes líticos.

A pesar de la importancia de LAT y sus homólogos, la latencia no depende enteramente de su expresión ya que existen una gran cantidad de eventos y factores adicionales que regulan el estado de latencia, su mantenimiento y reactivación a la fase lítica; aunque no se han esclarecido completamente, a continuación se exponen de manera breve los mecanismos principales que intervienen en el establecimiento, mantenimiento y reactivación de las infecciones latentes.

1.1.5. a. Establecimiento de la Latencia

Tras la infección, los alphaherpesvirus se replican principalmente en los epitelios de las mucosas y tarde o temprano ingresan a las neuronas sensoriales desde las cuales viajan intra-axonalmente hasta alcanzar los cuerpos neuronales de los ganglios sensoriales y, en algunos casos, el sistema nervioso central (Cohrs & Gildeen, 2001). Aunque aparentemente el virus se replica dentro de las neuronas ganglionares por aproximadamente una semana, ésta infección productiva parece ser distinta debido a que la mayoría de las neuronas sobreviven a la infección (Jones, 1999). Este cambio en el patrón de destrucción del virus al parecer se debe a que en las neuronas el complejo formado por la proteína viral VP16 y las proteínas celulares HCF-1, Oct-1 y LSD1 no pueden iniciar la transcripción de los genes IE virales debido a que el componente nuclear ND10 es distinto en este tipo de células e impide el inicio de la replicación (Cohrs & Gildeen, 2011), lo que trae como consecuencia que la proteína ICP0 no se sintetice, interrumpiendo el ciclo viral debido a la deficiente transcripción de los genes E y L. Un hecho importante para el establecimiento de la latencia es que en el interior de las neuronas los promotores del gen LAT, LAP1 y LAP2 se expresan activamente, a diferencia de otro tipo de células; esto último, sumado a la inexpressión de la proteína ICP4 que durante la infección productiva inhibe a los promotores, causa que LAT comience a expresarse y que sea el único gen viral en hacerlo durante la latencia (Jones, 2003). Otro hecho importante durante el establecimiento de la latencia es la configuración del ADN viral ya que es bien conocido que el genoma de HSV-1 adopta una forma circular y se encuentra asociado a nucleosomas (Deshmane & Fraser, 1989). Adicionalmente, se ha demostrado que LAT promueve la asociación de los genes líticos con la heterocromatina mientras reduce la eucromatina, lo que reprime la expresión de éstos (Wang *et al.*, 2005).

1.1.5. b. Mantenimiento de la Latencia

Los LATs se acumulan en grandes cantidades en el núcleo de las células infectadas latentemente debido a que tienen una vida media de varias horas (Valyi-Nagy *et al.*, 2007). Como se mencionó previamente, las proteínas más importantes durante la fase lítica (ICP0, ICP4, ICP34.5) son inhibidas por los LATs y aunque la forma precisa en la que está inhibición se lleva a cabo no se conoce, se ha mostrado que los LATs, particularmente el fragmento

más abundante y estable de 2 mil nt, funcionan como reguladores epigenéticos al controlar factores que modifican la estructura de la cromatina en lugares específicos del genoma (Wilson & Mohr, 2012), es decir, los LATs alteran la maquinaria celular de modificación de histonas para reprimir la expresión de genes líticos y al mismo tiempo, promueve su propia expresión ya que durante la latencia LAT se encuentra asociado a la eucromatina (Knipe & Cliffe, 2008). El uso de ARN para silenciar los genes líticos en las neuronas puede deberse a un mecanismo que se ha desarrollado para evitar la expresión de proteínas que pueden ser reconocidas por el sistema inmune del huésped (Knipe & Cliffe, 2008).

1.1.5. c. Reactivación desde la latencia

Aunque los mecanismos celulares que intervienen en la reactivación viral desde latencia se desconocen, se han identificado varios estímulos que inducen la reactivación como la exposición a los rayos UV, factores estresantes como el parto, daño en los tejidos e inmunosupresión por corticosteroides (Nicoll *et al.*, 2012). Al igual que durante el inicio de la infección, durante la reactivación es probable que los genes IE sean los primeros en expresarse, siendo la ICP0 una posible proteína vital para la reactivación (Rock, 1993).

1.1.5. d. Papel de los microARNs en la Latencia

Como se mencionó, durante la latencia los herpesvirus no se replican y la expresión está limitada a una región activa bien identificada que transcribe principalmente ARNs no codificantes, entre los cuales se encuentran los microARNs (miARNs), que son moléculas de aproximadamente 22 a 25 nucleótidos (nt) de longitud, y cuya principal función es la regulación en la expresión de genes. (Sullivan & Ganem, 2005). Los miARNs se derivan de precursores de ARN de mayor tamaño llamados pri-miARNs que son transcritos por la ARN Polimerasa II del hospedero y poseen una capuchón y una cola Poli-A. Estos pri-miARNs contienen al menos un precursor que forma horquillas *Stem-loop* (Kincaid & Sullivan, 2012). Estas estructuras son procesadas por la enzima ARNasa III llamada Drosha, que corta la secuencia en la base de la horquilla, lo que origina una molécula de aproximadamente 60 nt llamada pre-miARN, que es exportada hacia el citoplasma. Una vez en el citoplasma, el pre-miARN es reconocido por una enzima ARNasa III llamada Dicer que produce una molécula dúplex de la cual una hebra, que se considera como miARN maduro y es funcional, se incorpora al Complejo Silenciador Inducido por ARN (RISC) y la otra hebra no suele asociarse con este complejo y suele eliminarse, aunque no es raro que ambas hebras sean funcionales (Sorel & Dewals, 2016). La función del miARN en este complejo es guiar al RISC hacia el ARNm que posea una región de complementariedad con el miARN. Si esta complementariedad es amplia, la unión con el complejo RISC resulta en corte y degradación; si la complementariedad es por el contrario parcial (el emparejamiento está basado en una secuencia de 2 a 8 nt, que se conoce como Región Semilla) el complejo RISC solo se une al ARNm e impide su traducción (Sullivan & Ganem, 2005; Cullen, 2011).

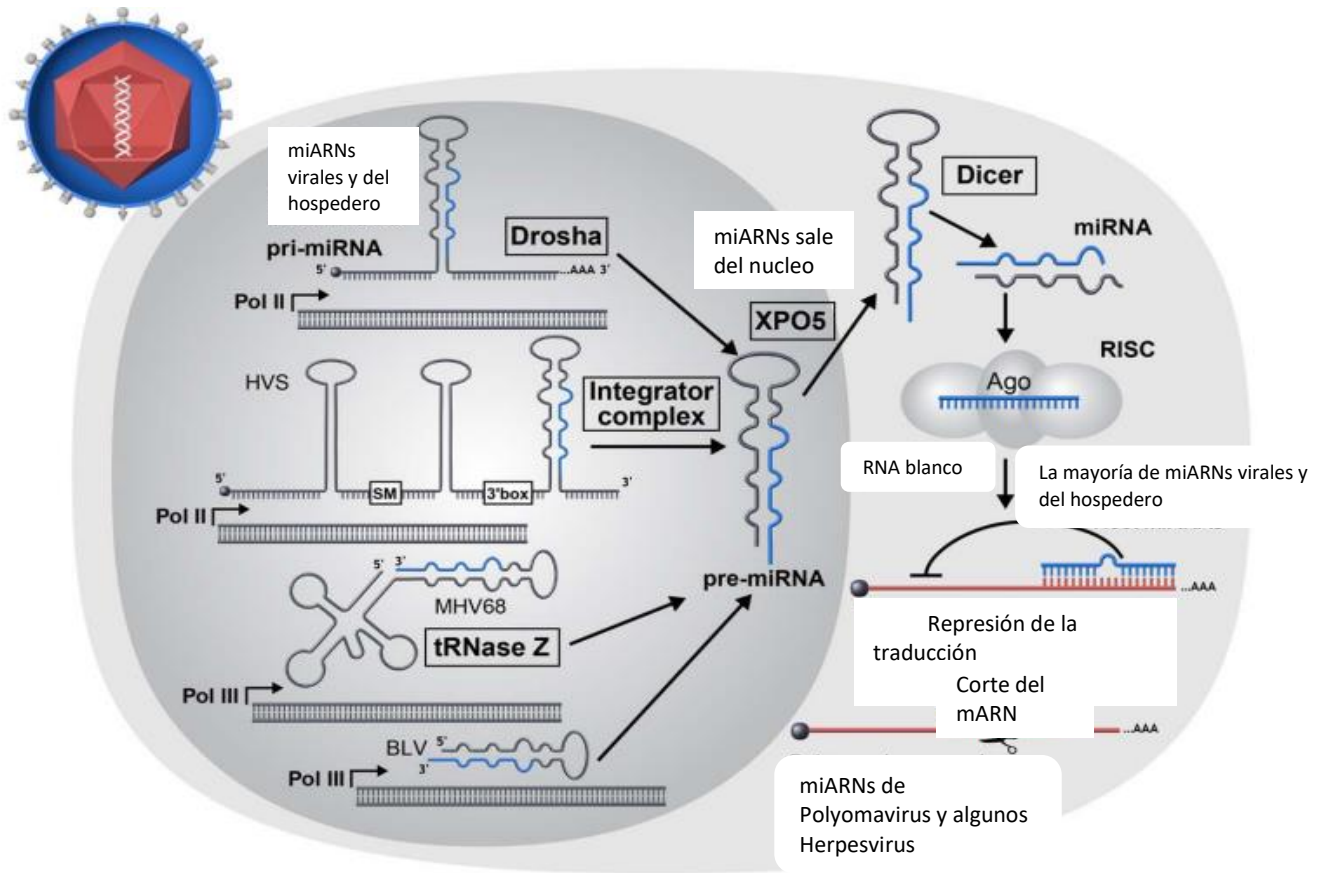


Figura 1.3. Biogénesis de los miARNs. Se muestra de forma esquemática la forma en que se sintetizan los miARNs. La mayoría de los pri-miARNs, tanto virales como del hospedero, son transcritos por la Polimerasa II (Pol II), para después ser procesados a pre-miARNs por otra enzima llamada Drosha. Sin embargo unos pocos virus, como el HVS, codifican distintos tipos de miARNs que requieren un procesamiento por el Complejo Integrador (Integrator Complex) para formar pre-miARNs. Otros virus, como el MHV68 y el BLV codifican miARNs que son procesados por otras enzimas o sintetizados por otro tipo de Polimerasas para crear pre-miARNs. Independientemente del origen de los pre-miARNs, éstos son transferidos al citoplasma por medio de la Exportina 5 (XPO5), en donde por medio de la enzima Dicer son cortados en miARN dúplex. Una de las hebras se incorpora a la proteína Argonauta (Ago) dentro del complejo RISC. El miARN dirige al complejo RISC hacia los ARNm blanco, en donde: 1) el miARN puede alinearse de forma incompleta con el ARNm blanco e inhibir la traducción; o 2) el alineamiento entre el miARN y el ARNm blanco es perfecto, lo que ocasiona la eliminación del ARNm blanco (Modificado de Kincaid & Sullivan, 2012).

Dado que los miARNs no producen una respuesta inmune, su uso durante la latencia es una estrategia adecuada para evitar el reconocimiento inmune, de modo que el virus puede mantenerse oculto (Sorel & Dewals, 2016). Por ello, a pesar de que se han detectado miARNs en las fases líticas, la mayor parte se han identificado en virus latentes. Los miARNs virales se pueden clasificar en dos tipos: los que son análogos a los miARNs del hospedero y que por tanto son capaces de sustituirlos y los que son específicamente virales, por tanto, para entender las funciones de los miARNs es necesario determinar los genes que regulan. Entre algunas de las funciones descubiertas se encuentran: prolongar la longevidad de las células infectadas, evasión de la respuesta inmune y regulación de proteínas virales para limitar el ciclo lítico y autorregulación de genes virales E (Grey *et al.*, 2008; Kincaid & Sullivan, 2012)

1.2. BIOINFORMÁTICA

La bioinformática se puede definir como la aplicación de técnicas computacionales para entender y organizar la información asociada con las macromoléculas biológicas (Luscombe *et al.*, 2001), por lo que puede considerarse que esta ciencia es el resultado de la conjunción inseparable entre las tecnologías informáticas, que van de la mano con el creciente poder de procesamiento de los sistemas computacionales modernos, y las ciencias biológicas, que día a día crean una cantidad de información que es imposible de manejar sin apoyo de alguna herramienta (Franco *et al.*, 2008). Actualmente, el principal objetivo de la bioinformática es analizar varios tipos de datos entre los que se incluyen secuencias de nucleótidos, aminoácidos, dominios de proteínas, estructuras proteicas, así como innovar metodologías para el acceso y la búsqueda de información en las bases de datos (Sánchez, 2010).

Claverie & Notredame (2007) dan una definición más coloquial y por tanto, más entendible sobre que es la bioinformática: “[...] se trata de buscar en bases de datos biológicas, comparar secuencias, mirar y analizar la estructura de las proteínas y (de forma más general) hacer preguntas de carácter biológico y biomédico con una computadora [...]” de manera que se pueden ahorrar meses de trabajo en el laboratorio con unas pocas horas de trabajo en una computadora.

2. ANTECEDENTES

Al ser un alphaherpesvirus, el CHV-1 también cuenta con la capacidad de desarrollar una infección latente, como lo demostraron Burr *et al.* (1996) al identificar material genético del virus en lugares asociados a una infección latente en otros herpesvirus por medio de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR); experimento que Miyoshi *et al.* (1999) confirmaron en un estudio posterior.

Como ya se mencionó, el gen LAT se encuentra codificado en la secuencia complementaria a los genes RL2 y RS1. La proteína del primero fue descrita y secuenciada por Miyoshi *et al.*, (2000), quienes en el mismo estudio establecieron que esa proteína cumple el mismo rol que su homólogo en el HSV-1. Mientras tanto el gen RS1 fue localizado y secuenciado en las regiones invertidas IRS/TRS por los mismo autores en un trabajo distinto (Miyoshi *et al.*, 1999a).

Con estos dos factores –la capacidad de establecer latencia y la presencia de los genes RL2 y RS1- es posible especular que el CHV-1 puede expresar LATs durante su fase latente. Por otra parte, a partir del gen LAT también se transcriben varios miARNs por lo que es factible suponer que el CHV-1 puede codificar también secuencias de miARNs. Adicionalmente se han identificado ORFs codificados en el gen LAT de algunos herpesvirus, lo que abre la posibilidad de que el CHV-1 también pueda sintetizar proteínas durante su latencia.

Por tanto, en la primera parte de este trabajo se compararon las secuencias de los genes RL2 y RS1 de HSV-1, BoHV-1, SuHV-1, EHV-1, FeHV-1 y CaHV-1 para establecer el nivel de similitud entre ellos y así determinar su relación para poder inferir una funcionalidad equivalente; la segunda parte se trata de predecir los posibles miARNs codificados en los genes RL2 y RS1 del CHV-1 para compararlos con la base de datos de los miARN ya identificados en otros herpesvirus y establecer su nivel de conservación; y la última parte del trabajo identificó ORFs en el gen LAT putativo del CHV-1 y se compararon con los péptidos identificados en el BoHV-1; todo esto con el objetivo principal de determinar si el CHV-1 posee una región asociada a la latencia en su genoma.

3. JUSTIFICACIÓN

La enfermedad causada por el Herpesvirus canino tipo 1 provoca una elevada mortalidad en los animales neonatos y recientemente se ha determinado una prevalencia muy alta de la enfermedad en criaderos de la zona cercana a la FES Cuautitlán en adultos aparentemente sanos (Valdivia, 2015).

Dado que se conoce poco de los mecanismos que regulan el ciclo de infección, de ingreso y egreso del estado de latencia, es necesario realizar un análisis básico del genoma ya secuenciado para localizar regiones relacionadas con la latencia que se han identificado en otros herpesvirus, logrando así avanzar en el desarrollo de medidas terapéuticas y profilácticas más eficientes.

4. HIPOTESIS

El genoma del Herpesvirus Canino tipo 1 contiene una región génica relacionada con los Transcriptos Asociados a la Latencia

5. OBJETIVO GENERAL

Identificar la presencia de regiones génicas relacionadas con los Transcriptos Asociados a Latencia en el genoma del Herpesvirus canino tipo 1 a través de herramientas bioinformáticas

6. OBJETIVOS PARTICULARES

- Comparar las regiones génicas activas durante la latencia en distintos herpesvirus
- Identificar y analizar secuencias precursoras de microARNs en la región génica relacionada con la latencia en el herpesvirus canino
- Identificar posibles productos derivados del gen LAT del CHV-1

7. METODOLOGÍA

I. Comparación de la similitud de los genes RL2 y RS1 del CHV-1 con sus homólogos y con los genes LAT identificado en otros Herpesvirus

Para ilustrar la localización de los genes RS1 y RL2 dentro de los genomas se construyeron esquemas con ayuda del programa SnapGene Viewer v. 4.0.3 (GSL Biotech, disponible en web: www.snapgene.com.)

Para llevar a cabo la comparación de las secuencias de los genes RL2 y RS1 del CHV-1 con otros herpesvirus relacionados se utilizaron los virus que se muestran en la tabla 7.1.

Herpesvirus	Cepa	No. Acceso	Localización del gen RL2 (ICP0)	Localización del gen RS1 (ICP4)	Localización del gen LAT
CHV-1	V777	KT819632.1	96038-97045 (1007 nt)	97595-101746 (4151 nt)	96038-101746 ³ (5708 nt)
HSV-1	17	JN555585.1	120675-124287 (3612 nt)	127173-131431 (4258 nt)	118777-127151 ¹ (8374 nt)
BoHV-1	Cooper	KU198480.1	101271-102305 (1034 nt)	103147-108081 (4934 nt)	100879-102305 ¹ (1426 nt)
SuHV-1	Becker	JF797219.1	95766-97259 (1493 nt)	102071-107203 (5132 nt)	95598-108385 ¹ (12787 nt)
FeHV-1	C-27	FJ478159.2	103923-105671 (1748 nt)	107116-111415 (4299 nt)	103923-111415 ² (7492 nt)
EHV-1	T953	KM593996.1	110307-111952 (1645 nt)	113840-118303 (4463 nt)	110307-118303 ² (7996 nt)

Se muestran los herpesvirus utilizados junto con su cepa y el número de acceso dentro de la base de datos de GenBank®. En la última columna se enlistan la localización del genoma del gen LAT. 1, gen secuenciado y disponible; 2, se han identificado transcritos de ARN en la región, pero no se ha secuenciado el gen correspondiente; 3, localización hipotética planteada en este trabajo.

Las secuencias elegidas para llevar a cabo la comparación se eligieron siguiendo dos criterios principales: 1) que tuvieran cercanía geográfica con el CHV-1; 2) que fuesen secuencias de cepas silvestres y 3) que tuviesen una acotación sobre sus genes secuenciados.

Es importante volver a mencionar que los herpesvirus poseen varias regiones que se repiten a lo largo de su genoma. En el caso de los Varicellovirus el gen RS1 se localiza en la región IRS, cuyo contenido es el mismo que la región TRS, por lo que éste gen se encuentra en dos regiones distintas. Sin embargo, en este trabajo se manejó únicamente la copia del gen localizada en la región IRS, ya que únicamente aquí se encuentra adyacente al gen RL2.

Para llevar a cabo el análisis de la similitud entre estos genes se utilizó el programa BLAST (v.2.6.0. 9 de Enero 2017). Este programa compara secuencias de nucleótidos o de aminoácidos con bases de datos que almacenan secuencias y calcula la significancia estadística de las coincidencias entre ellas.

Para utilizar el programa se ingresa a la página web <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, en donde aparece el menú principal (Fig. 7.1) que permite elegir el análisis en base al tipo de secuencias que se quieran utilizar.

En este caso se utilizaron secuencias de nucleótidos por lo que se acceso al subprograma Nucleotide BLAST.

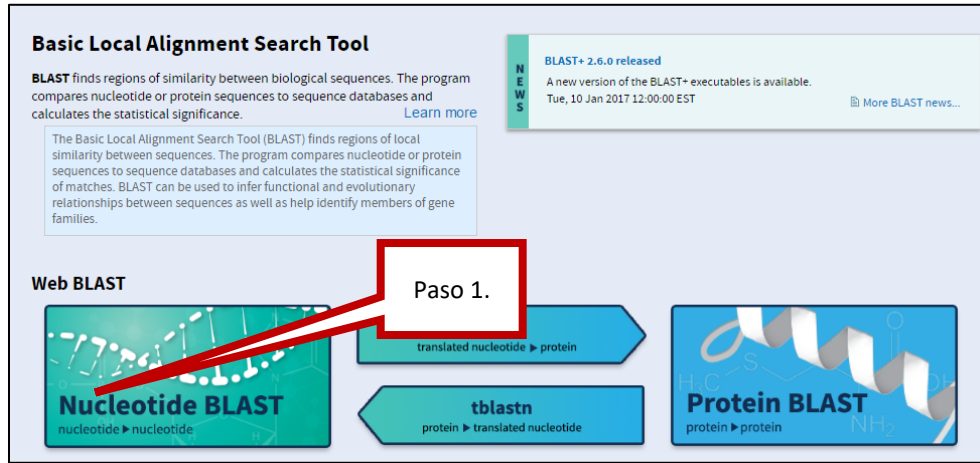


Fig. 7.1. Página principal de BLAST

Además de comparar secuencias con las bases de datos disponibles también es posible analizar únicamente dos secuencias, de manera que la búsqueda es más rápida y los resultados se pueden analizar de forma específica para las secuencias ingresadas. Para ello, debe activarse la casilla correspondiente (Figura 7.2)

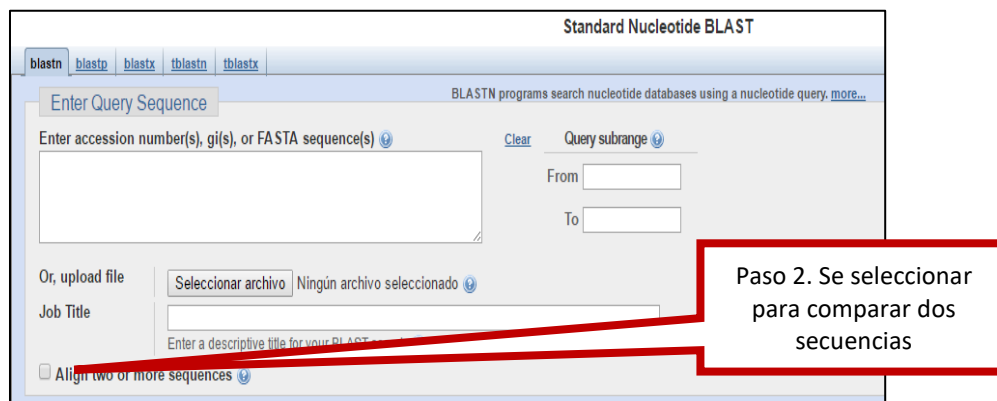


Fig. 7.2. Ventana inicial de BLASTn.

Al activarse la casilla de selección, aparece una interfaz de ingreso de datos en donde se muestran los dos menús que aparecen en la figura 7.3.

Ambos menús son similares, solo que el superior es para la secuencia de consulta (*Query Subject*), en donde se colocó la secuencia del CHV-1 y el inferior para la secuencia de comparación (*Subject Sequence*) en donde se colocaron las secuencias del gen LAT o las secuencias de los genes RL2 y RS1 de los herpesvirus en los cuales no se ha identificado completamente el gen LAT.

Los datos se pueden ingresar de tres formas: 1) directamente en formato FASTA, 2) a través del número de acceso de GenBank® y delimitando la región específica deseada en la parte izquierda de la pantalla.

Y 3) subiendo un archivo que se haya descargado a la memoria de la computadora. En este caso se utilizó la opción 2, y se ingresaron los datos por medio de su número de acceso.

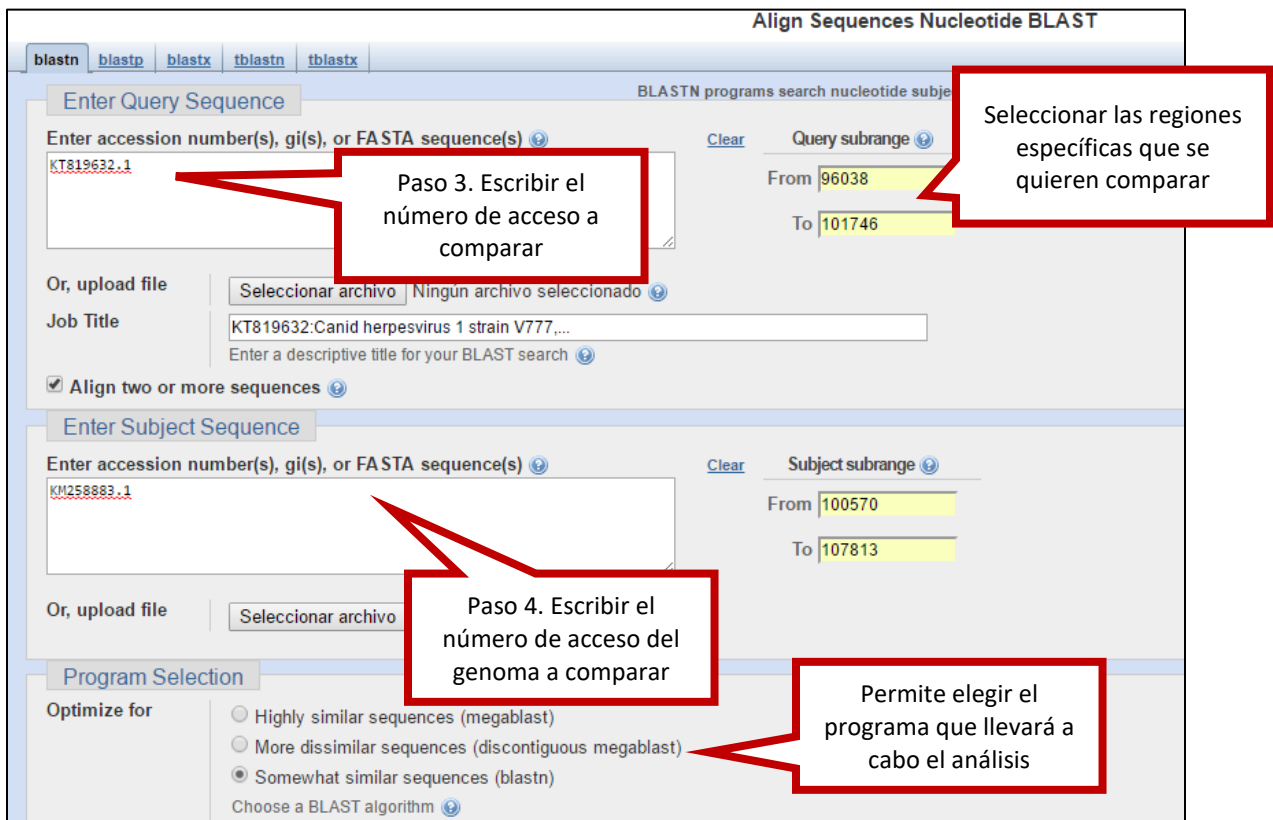


Fig. 7.3. Ventana de Ingreso de Datos. El tercer submenú *Program Selection* permite elegir el nivel de flexibilidad de la búsqueda. Megablast se utiliza para secuencias estrechamente relacionadas. Discontinuous megablast permite algunos huecos en los alineamientos. BlastN es el menos rígido.

Una vez ingresados los datos es necesario seleccionar el programa que llevará a cabo el análisis; para esta comparación se eligió el programa *blastn* ya que es la opción menos estricta y permite identificar regiones similares de menor extensión que los otros programas pasan por alto. El siguiente paso es desplegar la ventana de *Algorithm Parameter* que se encuentra en la parte inferior de la pantalla (Figura 7.4.).

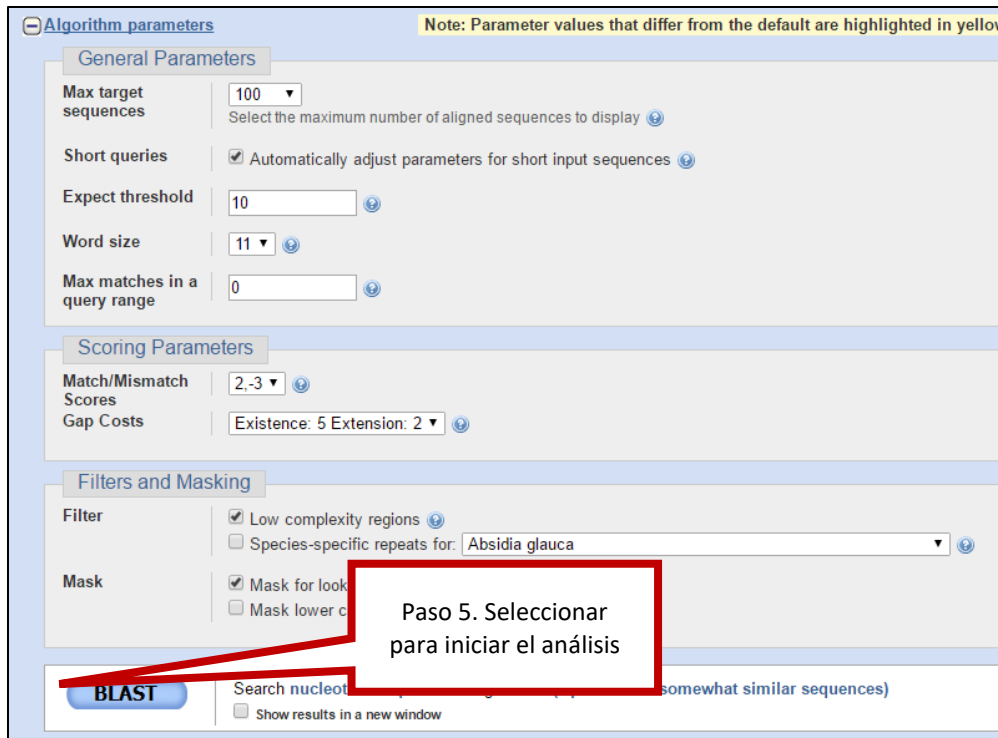


Fig. 7.4. Ventana de Parámetros del Algoritmo.

Los parámetros elegidos para llevar a cabo la comparación se muestran en la tabla 7.2.

Tabla 7.2. Parámetros utilizados para la comparación de los genes RL2 y RS1	
Parámetros	Valor asignado
Programa seleccionado	blastn
Max Target Sequence	100
Short Queries	Activado
Expect Treshold	10
Word Size	11
Match/Mismatch Score	2/-3
Gap Costs	5:2
Filter Low Complexity Regions	Activado
Filter Species-Specific Repeats For	Desactivado
Mask for Lookup Table	Activado
Mask Lower Case Letters	Desactivado

II. Identificación y análisis de microARNs derivados de la posible localización del gen LAT en CHV-1

MIREval 2.0. (Gao *et al.*, 2013) es un software online que se utiliza para buscar secuencias de nucleótidos que son precursoras de microARNs (miARNs). Dado que el gen LAT se transcribe en varios miARNs, al identificar a éstos también se identificará la porción precursora dentro del genoma.

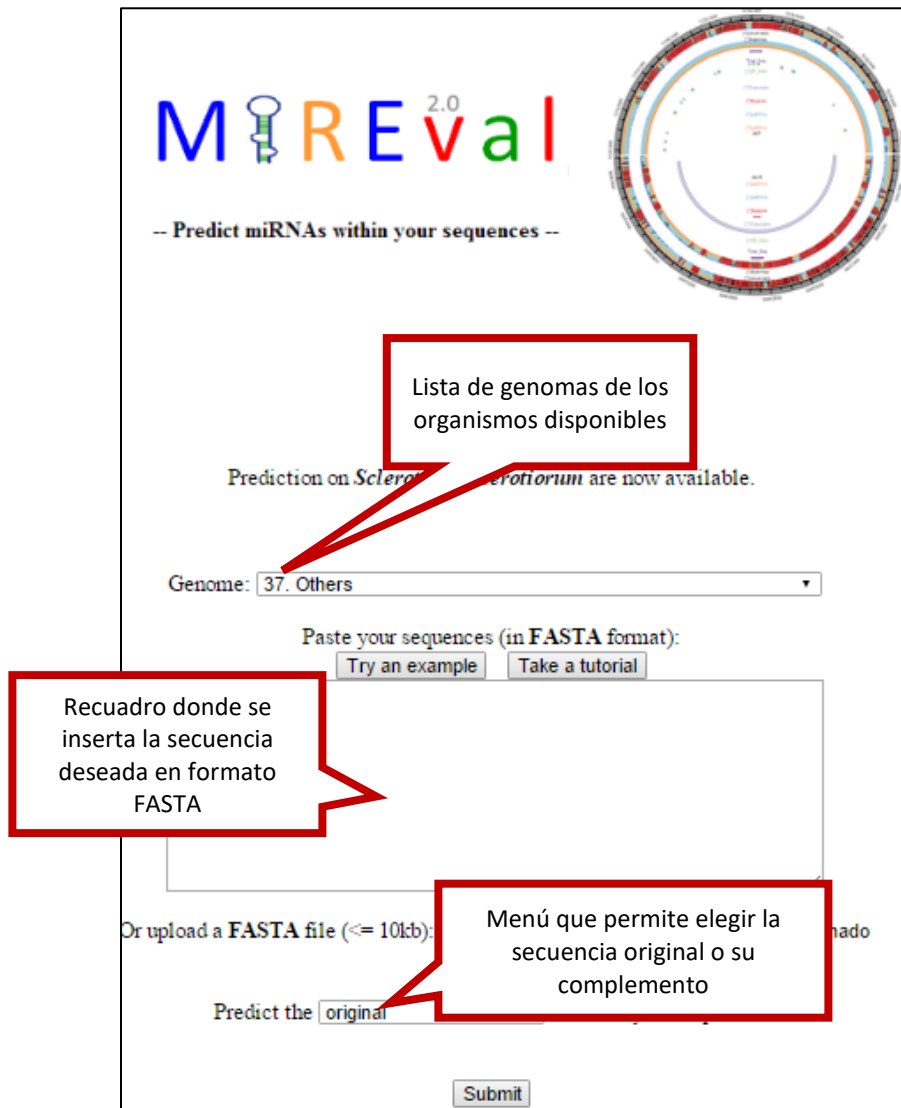
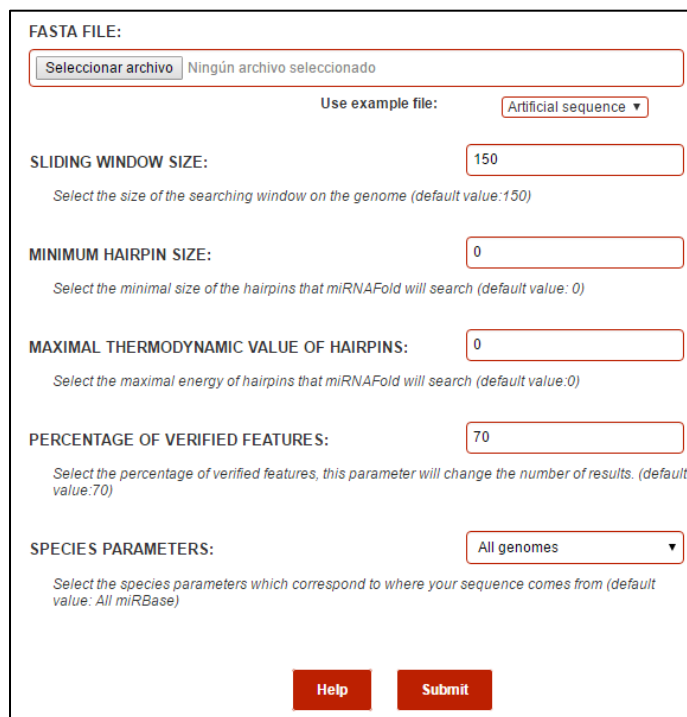


Figura 7.5. Página principal de MIREval

Una vez que se tiene la secuencia deseada en formato FASTA se inserta en la ventana de la página principal de MIREval (Fig. 7.5) y se envía para su análisis.

En este trabajo se utilizó la misma secuencia de 5708 nt, que abarca a los genes RL2 y RS1, utilizada en la metodología del punto I. Estos genes se transcriben en sentido inverso al gen LAT.

Como un forma de asegurar en la medida de lo posible la fiabilidad de los miARNs encontrados, se utilizó un segundo programa llamado miRNAFold v. 1.0 (Tav *et al.*, 2016) para deducir por separado los posibles miARNs en la misma secuencia del genoma del CHV-1. miRNAFold (Figura 7.6) tiene una interfaz que no permite el ingreso directo de datos por lo que fue necesario obtener la secuencia utilizada en un archivo con formato FASTA. En la parte inferior de la página principal se enlistan una serie de parámetros que se mantuvieron en la configuración por defecto para este análisis.



The screenshot displays the miRNAFold web interface with the following elements:

- FASTA FILE:** A file selection button labeled "Seleccionar archivo" and a text field showing "Ningún archivo seleccionado".
- Use example file:** A dropdown menu currently set to "Artificial sequence".
- SLIDING WINDOW SIZE:** A text input field containing the value "150". Below it, a note reads: "Select the size of the searching window on the genome (default value:150)".
- MINIMUM HAIRPIN SIZE:** A text input field containing the value "0". Below it, a note reads: "Select the minimal size of the hairpins that miRNAFold will search (default value: 0)".
- MAXIMAL THERMODYNAMIC VALUE OF HAIRPINS:** A text input field containing the value "0". Below it, a note reads: "Select the maximal energy of hairpins that miRNAFold will search (default value:0)".
- PERCENTAGE OF VERIFIED FEATURES:** A text input field containing the value "70". Below it, a note reads: "Select the percentage of verified features, this parameter will change the number of results. (default value:70)".
- SPECIES PARAMETERS:** A dropdown menu currently set to "All genomes". Below it, a note reads: "Select the species parameters which correspond to where your sequence comes from (default value: All miRBase)".
- At the bottom, there are two red buttons: "Help" and "Submit".

Figura 7.6. Página principal de miRNAFold

Una vez que se obtuvieron los posibles precursores de miARNs desde ambos programas, sus secuencias se sometieron a un primer filtro, mediado por el programa miRBoost v. 1.0 (Tran *et al.*, 2015), que realiza una selección entre las secuencias que tienen mayor probabilidad de ser precursores reales de miARN y pseudo-precursores en base a un algoritmo que combina la secuencia de nucleótidos, la estructura y la Energía Libre Mínima (MFE) (Figura 7.6), parámetros que el programa compara con una base de datos en donde se almacenan las características de los miARNs que ya se han identificado. El programa no permite insertar directamente las secuencias problema, por lo que es necesario obtener el formato FASTA de la secuencia y subirlo como un archivo adjunto.

Figura. 7.6. Página principal de miRBoost.

El siguiente filtro fue eliminar las secuencias que se sobreponían entre sí, por lo que se llevó a cabo un alineamiento con el programa de las secuencias obtenidas sobre la región del genoma del que se obtuvieron los miARNs. De esta manera se eliminaron las secuencias redundantes y se obtuvieron las secuencias únicas. Para esto se utilizaron las secuencias predichas obtenidas y se colocaron como secuencias Blanco mientras que la región utilizada del CHV-1 se colocó en la secuencia Problema. Los parámetros utilizados se muestran en la tabla 7.3.

Tabla 7.3. Parámetros utilizados para la eliminación de secuencias redundantes de miARNs	
Parámetros	Valor asignado
Programa seleccionado	megablast
Max Target Sequence	100
Short Queries	Activado
Expect Treshold	10
Word Size	28
Match/Mismatch Score	1,-2
Gap Costs	Linear
Filter Low Complexity Regions	Activado
Filter Species-Specific Repeats For	Desactivado
Mask for Lookup Table	Activado
Mask Lower Case Letters	Desactivado

Una vez que se obtuvieron las secuencias con mayor probabilidad de ser precursores de miARNs se comprobó si éstos estaban conservados en otros herpesvirus, por lo que se obtuvieron todas las secuencias de miARNs maduros derivadas de herpesvirus (Tabla 7.4) desde la base de datos miRBase v. 21 (<http://www.mirbase.org/index.shtml>) (Kozomora & Griffiths-Jones, 2014) con el fin de confirmar o descartar la conservación de las “secuencias semilla”, que son las secciones de los miARN que llevan a cabo la interferencia en la expresión génica.

Con las secuencias obtenidas se realizó un análisis con el programa BLASTn para encontrar similitudes entre las secuencias (Tabla 7.5).

Tabla 7.4. Herpesvirus en los que se han localizado miARNs.		
Herpesvirus	Siglas	No. de miARNs identificados
Herpesvirus Bovino 1	bhv1	10 precursores, 12 maduros
Herpesvirus Bovino 5	bhv5	5 precursores, 5 maduros
Duck Enteritis Virus	dev	24 precursores, 33 maduros
Virus de Epstein Barr	ebv	25 precursores, 44 maduros
Herpes B virus	hbv	12 precursores, 15 maduros
Citomegalovirus humano	hcmv	15 precursores, 26 maduros
Herpesvirus Humano 6B	hhv6b	4 precursores, 8 maduros
Herpes Simplex Virus 1	hsv1	18 precursores, 27 maduros
Herpes Simplex Virus 2	hsv2	18 precursores, 24 maduros
Herpesvirus saimirí cepa A11	hvsa	3 precursores, 6 maduros
Herpesvirus de pavos	hvt	17 precursores, 28 maduros
Virus de Laringotraqueítis infecciosa	iltv	7 precursores, 10 maduros
Herpesvirus asociado al sarcoma de Kaposi	kshv	13 precursores, 25 maduros
Virus de la enfermedad de Marek tipo 1	mdv1	14 precursores, 26 maduros
Virus de la enfermedad de Marek tipo 2	mdv2	18 precursores, 36 maduros
Gammaherpesvirus de raton 68	mghv	15 precursores, 28 maduros
Virus de Pseudorabia	prv	13 precursores, 13 maduros

Tabla 7.5. Parámetros utilizados para la determinación de la conservación de las secuencias de miARN deducidas para el CHV-1.	
Parámetros	Valor asignado
Programa seleccionado	blastn
Max Target Sequence	100
Short Queries	Activado
Expect Treshold	0.1
Word Size	11
Match/Mismatch Score	2,-3
Gap Costs	5:2
Filter Low Complexity Regions	Activado
Filter Species-Specific Repeats For	Desactivado
Mask for Lookup Table	Activado
Mask Lower Case Letters	Desactivado

III. Identificación de posibles productos derivados del gen LAT del CHV-1

Para identificar posibles productos proteicos derivados del gen LAT putativo del CHV-1 se utilizó la misma secuencia de 5708 nt utilizada para comparar las secuencias y para identificar los microARNs en los apartados anteriores.

Se utilizó el programa ORF Finder v. 2.12.5, 18 de Septiembre de 2017 (Wheeler *et al.*, 2003) disponible en la dirección web <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/> para analizar la secuencia mencionada en busca de regiones traducibles delimitadas por codones de inicio y codones de terminación. Esta aplicación online tiene un límite para analizar secuencias de máximo 50 mil nt de longitud. Sin embargo, permite filtrar los resultados de acuerdo al tamaño mínimo de nucleótidos, permite seleccionar entre 31 tipos de códigos genéticos y es posible restringir los codones de inicio utilizados, así como filtrar los ORF que se encuentren dentro de otros. Para este trabajo se utilizaron los parámetros estándar, que se muestran en la Figura 7.7.

Enter Query Sequence

Enter accession number, gi, or nucleotide sequence in FASTA format:

From: To:

Choose Search Parameters

Minimal ORF length (nt): 75 ▼

Genetic code: 1. Standard ▼

ORF start codon to use:

- "ATG" only
- "ATG" and alternative initiation codons
- Any sense codon

Ignore nested ORFs:

Start Search / Clear

Figura 7.7. Página de inicio de la herramienta ORF Finder del NCBI.

El programa ORF Finder permite el análisis de la secuencia insertada y de su complemento, además de arrojar resultados en los seis marcos de lectura (+1, +2, +3, -1, -2 y -3) y muestra los resultados en una interfaz gráfica, que facilita la ubicación precisa de cada uno de ellos. Los ORFs resultantes se sometieron a un análisis por medio de la herramienta complementaria del ORF Finder llamada SmartBlast, que busca en la base de datos proteínas similares y las relaciona entre sí de acuerdo con las similitudes entre sus aminoácidos.

Los resultados de la comparación entre la región relacionada con el gen LAT de varios herpesvirus y la misma región en el CHV-1 se muestran en la Tabla 8.1.

Tabla 8.1. Alineamientos entre los genes LAT de varios Herpesvirus y el gen LAT putativo del CHV-1							
	# Alineamiento	Localización del alineamiento		Similitud	Puntaje	Valor E	Sentido
		Secuencia Problema (CHV-1)	Secuencia blanco				
HSV-1	1	100096-100107 RS1	123071-123060 RL2	12/12 (100%)	22.9 bits (24)	6.0	+/-
BoHV-1	1	99058-99068 RS1	101712-101722 RL2	11/11 (100%)	21.1 bits (22)	3.5	+/+
SuHV-1	1	101525-101537 RS1	100613-100601 Entre genes RL2 y RS1	13/13 (100%)	24.7 bits (26)	2.6	+/-
	2	99116-99127 RS1	97541-97530 Entre genes RL2 y RS1	12/12 (100%)	22.9 bits (24)	9.1	+/-
	3	97378-97389 Entre genes RL2 y RS1	97785-97796 Entre genes RL2 y RS1	12/12 (100%)	22.9 bits (24)	9.1	+/+
	4	97412-97423 Entre genes RL2 y RS1	97785-97796 Entre genes RL2 y RS1	12/12 (100%)	22.9 bits (24)	9.1	+/+
	5	97446-97457 Entre genes RL2 y RS1	97785-97796 Entre genes RL2 y RS1	12/12 (100%)	22.9 bits (24)	9.1	+/+
	6	97480-97491 Entre genes RL2 y RS1	97785-97796 Entre genes RL2 y RS1	12/12 (100%)	22.9 bits (24)	9.1	+/+
	7	101539-101553 RS1	101946-101932 Entre genes RL2 y RS1	14/15 (93%)	22.9 bits (24)	9.1	+/-
	8	99693-99704 RS1	104163-104174 RS1	12/12 (100%)	22.9 bits (24)	9.1	+/+
	9	101057-101068 RS1	106025-106036 RS1	12/12 (100%)	22.9 bits (24)	9.1	+/+
FeHV-1	1	97974-99088 RS1	107622-108739 RS1	713/1125 (63%)	156 bits (172)	4e-40	+/+
	2	100014-100486 RS1	109800-110275 RS1	318/476 (67%)	145 bits (160)	6e-37	+/+
	3	96852-97046 RL2	105478-105672 RL2	127/195 (65%)	46.4 bits (50)	5e-07	+/+
	4	99691-99703 RS1	107176-107188 RS1	13/13 (100%)	24.7 bits (26)	1.5	+/+
	5	99682-99704 RS1	110364-110386 RS1	19/23 (83%)	24.7 bits (26)	1.5	+/+
	6	99923-99934 RS1	104517-104506 RL2	12/12 (100%)	22.9 bits (24)	5.3	+/-
	7	101187-101198 RS1	104818-104807 RL2	12/12 (100%)	22.9 bits (24)	5.3	+/-
	8	100748-100759 RS1	109694-109683 RS1	12/12 (100%)	22.9 bits (24)	5.3	+/-
	9	99316-99330 RS1	111198-111184 RS1	14/15 (93%)	22.9 bits (24)	5.3	+/-
EHV-1	1	99990-100507 RS1	116550-117067 RS1	346/519 (67%)	149 bits (164)	6e-38	+/+
	2	96052-96082 RL2	111001-111031 RL2	24/31 (77%)	24.7 bits (26)	1.6	+/+
	3	96905-96922 RL2	111812-111829 RL2	16/18 (89%)	24.7 bits (26)	1.6	+/+
	4	98405-98416 RS1	112659-112648 Entre los genes RL2 y RS1	12/12 (100%)	22.9 bits (24)	5.7	+/-

En el siguiente apartado se muestra un esquema (Figura 8.2) obtenido del programa BLAST®, de las regiones similares entre los genes comparados.

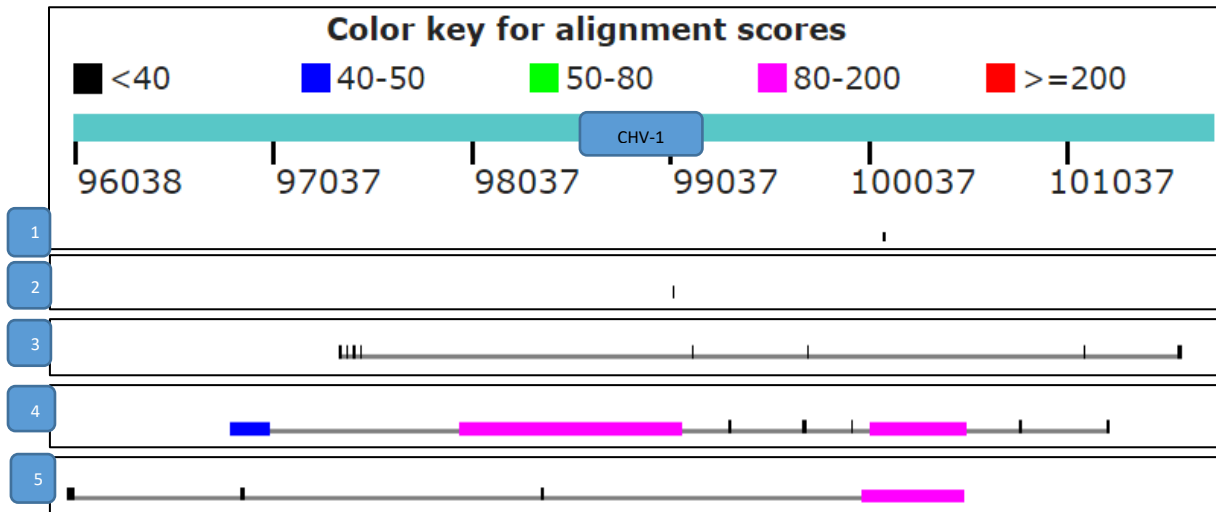


Figura 8.2. Comparación entre las secuencias del gen LAT entre diferentes herpesvirus. El código de colores de la parte superior indica aproximadamente el número de coincidencias halladas. La franja horizontal de color azul representa el genoma de CHV-1, con indicaciones espaciadas de los pares de bases. 1, HSV-1; 2, BoHV-1; 3, SuHV-1; 4, FeHV-1; 5, EHV-1.

II. Identificación de microARNs derivados de la posible localización de gen LAT en CHV-1

Al analizar con el programa miREval la secuencia que abarca la secuencia complementaria a los genes RL2 y RS1 (pares de bases 96038 a 101746), en cuya localización se ha identificado al gen que codifica los transcriptos asociados a la latencia (LATs) en otros herpesvirus, se encontraron 40 secuencias preliminares que cumplen con el parámetro básico de un precursor de microARN (Pre-miARN), es decir, la capacidad de formar estructuras secundarias que corresponden a un modelo de tallo-bulbo (*Stem-loop*) y/o una MFE mayor a 20. Aunque el programa miREval sugiere que la MFE suele ser menor a -20Kcal, el programa miRBoost toma otros parámetros (como la secuencia y cierta similitud con secuencias en la base de datos existentes) para clasificar un miARN como real o no.

En contraste el análisis del programa miRNAFold arrojó 82 posibles secuencias precursoras de miARN. Sin embargo el hecho de que todas éstas secuencias obtenidas formen estructuras de *Stem-loop* no significa que sean miARNs reales; por lo tanto, para obtener las secuencias que tienen mayor posibilidad de codificar miARNs reales las secuencias obtenidas de ambos programas se analizaron con el programa miRBoost, lo que dio como resultado la selección de nueve secuencias candidatas de miREval (Tabla 8.2) y 26 de miRNAFold para ser consideradas precursores reales de miARN (Tablas 8.3)

Posibles pre-miRNA	MFE	Clasificación de miRBoost	Posibles pre-miRNA	MFE	Clasificación de miRBoost
Pred 1	(-17.00)	Pseudo pre-miRNA	Pred 21	(-27.20)	Pseudo pre-miRNA
Pred 2	(-27.50)	Real pre-miRNA	Pred 22	(-22.10)	Pseudo pre-miRNA
Pred 3	(-27.60)	Real pre-miRNA	Pred 23	(-14.90)	Pseudo pre-miRNA
Pred 4	(-32.40)	Real pre-miRNA	Pred 24	(-17.00)	Pseudo pre-miRNA
Pred 5	(-32.40)	Real pre-miRNA	Pred 25	(-23.20)	Real pre-miRNA
Pred 6	(-32.40)	Real pre-miRNA	Pred 26	(-27.10)	Pseudo pre-miRNA
Pred 7	(-18.40)	Real pre-miRNA	Pred 27	(-22.60)	Pseudo pre-miRNA
Pred 8	(-20.50)	Pseudo pre-miRNA	Pred 28	(-21.60)	Pseudo pre-miRNA
Pred 9	(-24.10)	Pseudo pre-miRNA	Pred 29	(-16.40)	Pseudo pre-miRNA
Pred 10	(-23.40)	Pseudo pre-miRNA	Pred 30	(-16.30)	Pseudo pre-miRNA
Pred 11	(-20.20)	Pseudo pre-miRNA	Pred 31	(-17.70)	Pseudo pre-miRNA
Pred 12	(-21.30)	Pseudo pre-miRNA	Pred 32	(-16.90)	Pseudo pre-miRNA
Pred 13	(-18.00)	Pseudo pre-miRNA	Pred 33	(-16.20)	Pseudo pre-miRNA
Pred 14	(-16.00)	Pseudo pre-miRNA	Pred 34	(-18.70)	Pseudo pre-miRNA
Pred 15	(-9.10)	Pseudo pre-miRNA	Pred 35	(-18.40)	Real pre-miRNA
Pred 16	(-18.00)	Pseudo pre-miRNA	Pred 36	(-24.60)	Pseudo pre-miRNA
Pred 17	(-14.90)	Pseudo pre-miRNA	Pred 37	(-25.30)	Pseudo pre-miRNA
Pred 18	(-23.60)	Real pre-miRNA	Pred 38	(-23.40)	Pseudo pre-miRNA
Pred 19	(-18.20)	Pseudo pre-miRNA	Pred 39	(-17.80)	Pseudo pre-miRNA
Pred 20	(-23.00)	Pseudo pre-miRNA	Pred 40	(-17.80)	Pseudo pre-miRNA

Tabla 8.3. Secuencias con estructura en <i>tallo-bulbo</i> obtenidas con el programa miRNAFold con la categoría asignada por el programa miRBoost					
Posibles pre-miRNA	MFE	Clasificación de miRBoost	Posibles pre-miRNA	MFE	Clasificación de miRBoost
Pred 1	(-33.6)	Pseudo pre-miRNA	Pred 42	(-20.4)	Pseudo pre-miRNA
Pred 2	(-15.7)	Real pre-miRNA	Pred 43	(-18.7)	Pseudo pre-miRNA
Pred 3	(-16.5)	Real pre-miRNA	Pred 44	(-17.00)	Real pre-miRNA
Pred 4	(-34.6)	Pseudo pre-miRNA	Pred 45	(-35.6)	Pseudo pre-miRNA
Pred 5	(-22.4)	Pseudo pre-miRNA	Pred 46	(-33.7)	Pseudo pre-miRNA
Pred 6	(-23.7)	Pseudo pre-miRNA	Pred 47	(-28.8)	Real pre-miRNA
Pred 7	(-35.4)	Pseudo pre-miRNA	Pred 48	(-17.9)	Real pre-miRNA
Pred 8	(-26.9)	Real pre-miRNA	Pred 49	(-28.3)	Pseudo pre-miRNA
Pred 9	(-27.00)	Pseudo pre-miRNA	Pred 50	(-26.6)	Pseudo pre-miRNA
Pred 10	(-37.3)	Pseudo pre-miRNA	Pred 51	(-24.4)	Pseudo pre-miRNA
Pred 11	(-16.6)	Pseudo pre-miRNA	Pred 52	(-41.2)	Pseudo pre-miRNA
Pred 12	(-12.4)	Real pre-miRNA	Pred 53	(-33.0)	Real pre-miRNA
Pred 13	(-24.6)	Pseudo pre-miRNA	Pred 54	(-40.3)	Pseudo pre-miRNA
Pred 14	(-21.3)	Real pre-miRNA	Pred 55	(-42.5)	Real pre-miRNA
Pred 15	(-39.1)	Real pre-miRNA	Pred 56	(-20.4)	Real pre-miRNA
Pred 16	(-25.2)	Pseudo pre-miRNA	Pred 57	(-20.9)	Pseudo pre-miRNA
Pred 17	(-27.2)	Pseudo pre-miRNA	Pred 58	(-26.6)	Pseudo pre-miRNA
Pred 18	(-19.1)	Real pre-miRNA	Pred 59	(-35.9)	Pseudo pre-miRNA
Pred 19	(-29.8)	Pseudo pre-miRNA	Pred 60	(-48.9)	Real pre-miRNA
Pred 20	(-33.8)	Pseudo pre-miRNA	Pred 61	(-35.9)	Real pre-miRNA
Pred 21	(-30.9)	Pseudo pre-miRNA	Pred 62	(-33.2)	Real pre-miRNA
Pred 22	(-21.7)	Real pre-miRNA	Pred 63	(-33.5)	Pseudo pre-miRNA
Pred 23	(-32.1)	Pseudo pre-miRNA	Pred 64	(-36.00)	Pseudo pre-miRNA
Pred 24	(-34.7)	Pseudo pre-miRNA	Pred 65	(-34.7)	Pseudo pre-miRNA
Pred 25	(-23.6)	Real pre-miRNA	Pred 66	(-22.7)	Pseudo pre-miRNA
Pred 26	(-41.1)	Pseudo pre-miRNA	Pred 67	(-45.8)	Pseudo pre-miRNA
Pred 27	(-31.00)	Pseudo pre-miRNA	Pred 68	(-35.7)	Pseudo pre-miRNA
Pred 28	(-24.1)	Pseudo pre-miRNA	Pred 69	(-35.4)	Pseudo pre-miRNA
Pred 29	(-17.9)	Real pre-miRNA	Pred 70	(-33.1)	Pseudo pre-miRNA
Pred 30	(-42.9)	Pseudo pre-miRNA	Pred 71	(-38.9)	Pseudo pre-miRNA
Pred 31	(-27.1)	Real pre-miRNA	Pred 72	(-47.9)	Pseudo pre-miRNA
Pred 32	(-29.1)	Real pre-miRNA	Pred 73	(-38.4)	Pseudo pre-miRNA
Pred 33	(-23.5)	Pseudo pre-miRNA	Pred 74	(-39.5)	Pseudo pre-miRNA
Pred 34	(-41.00)	Pseudo pre-miRNA	Pred 75	(-38.3)	Pseudo pre-miRNA
Pred 35	(-30.7)	Pseudo pre-miRNA	Pred 76	(-23.4)	Pseudo pre-miRNA
Pred 36	(-38.7)	Pseudo pre-miRNA	Pred 77	(-32.5)	Real pre-miRNA
Pred 37	(-33.2)	Real pre-miRNA	Pred 78	(-19.3)	Real pre-miRNA
Pred 38	(-26.6)	Real pre-miRNA	Pred 79	(-31.4)	Real pre-miRNA
Pred 39	(-43.6)	Real pre-miRNA	Pred 80	(-38.1)	Pseudo pre-miRNA
Pred 40	(-29.4)	Pseudo pre-miRNA	Pred 81	(-43.5)	Pseudo pre-miRNA
Pred 41	(-20.8)	Pseudo pre-miRNA	Pred 82	(-32.8)	Pseudo pre-miRNA

Sobre éstas 35 secuencias obtenidas se llevó a cabo un filtro que consistió en eliminar a las secuencias redundantes que se sobreponían entre sí por medio de un alineamiento con la región del genoma del CHV-1 de donde fueron deducidos, por lo que de las 26 secuencias del programa miRNAFold únicamente 12 se conservaron - 8,14,22,25,32,37,39,47,55,60,77,79 - (Figura 8.3). De las nueve secuencias candidatas del programa miREval, se conservaron únicamente cuatro -2, 6, 18,25- (Figura 8.4).

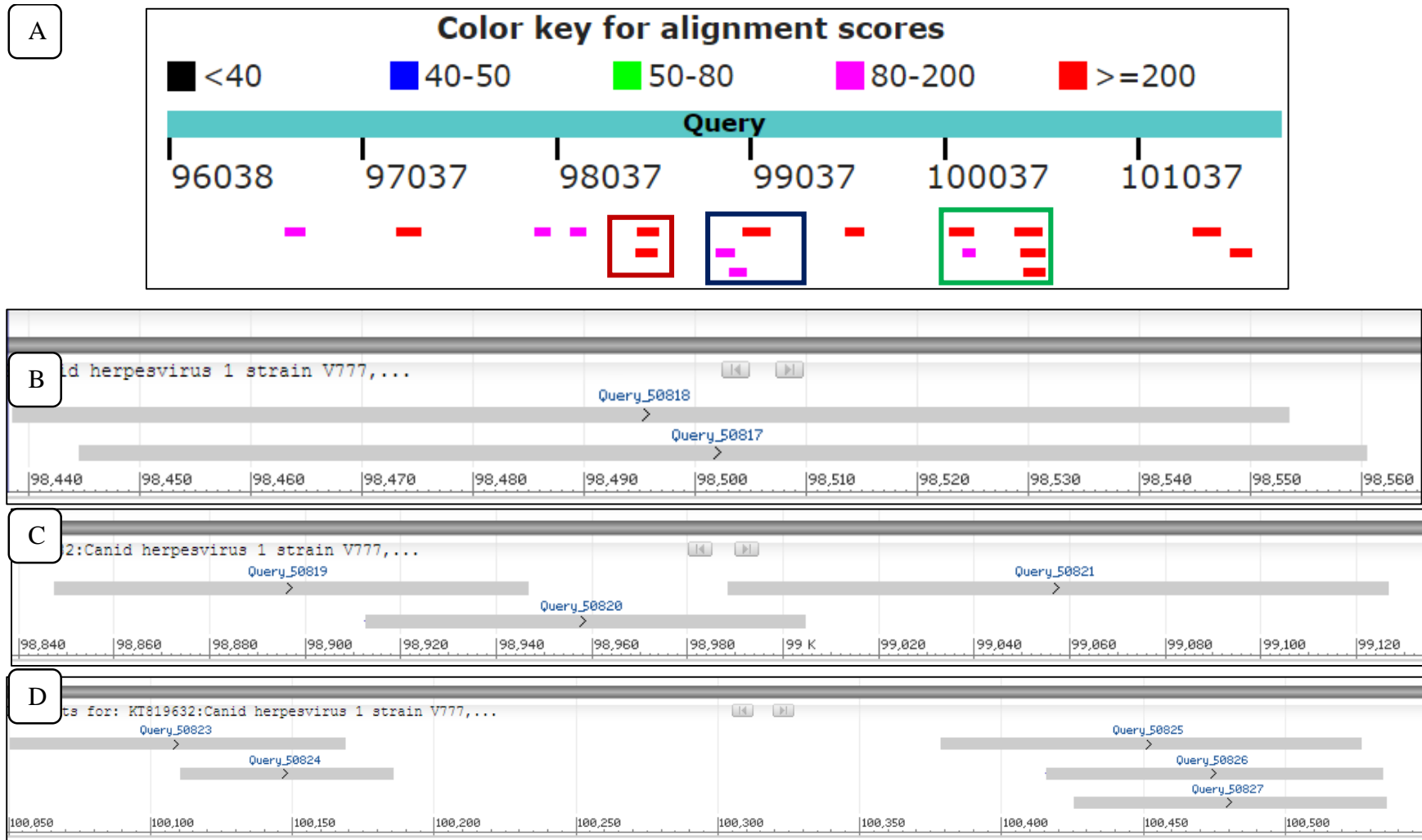
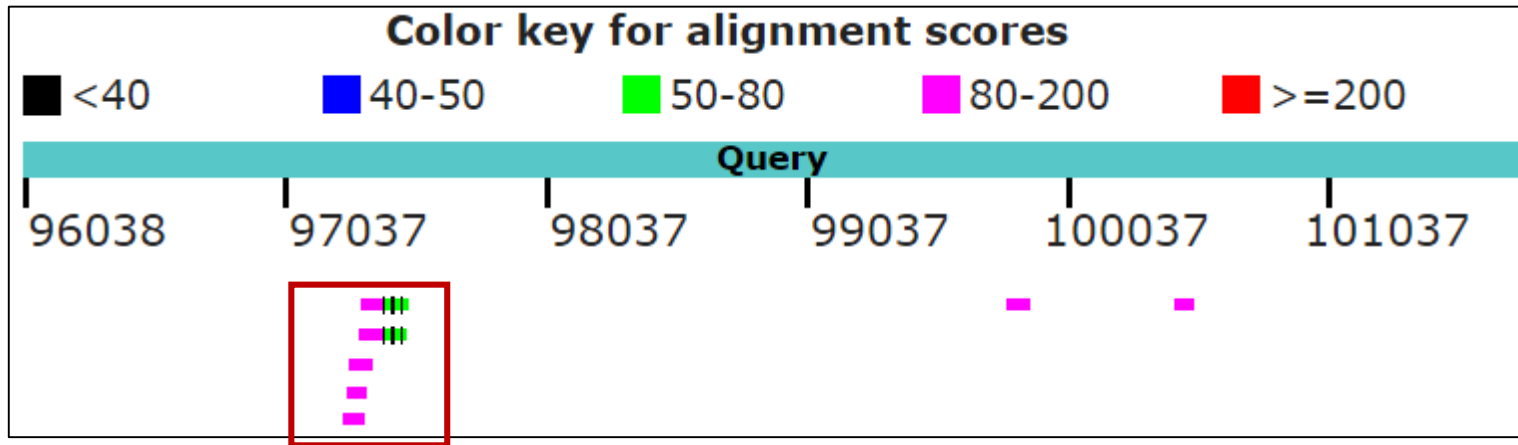


Figura 8.3. Secuencias obtenidas del programa miRNAFold. En A, se muestra un diagrama de la disposición de las secuencias con respecto a la región génica relacionada a la latencia del CHV-1. B muestra una ampliación del recuadro rojo, que corresponde a las secuencias 31 y 32 en orden descendente ; C, muestra una ampliación de recuadro azul, que abarca a las secuencias 37 a 39 de izquierda a derecha; y D, es una ampliación del recuadro verde, que muestra las secuencias 55-56 y 60-63, de izquierda a derecha.

A)



B)

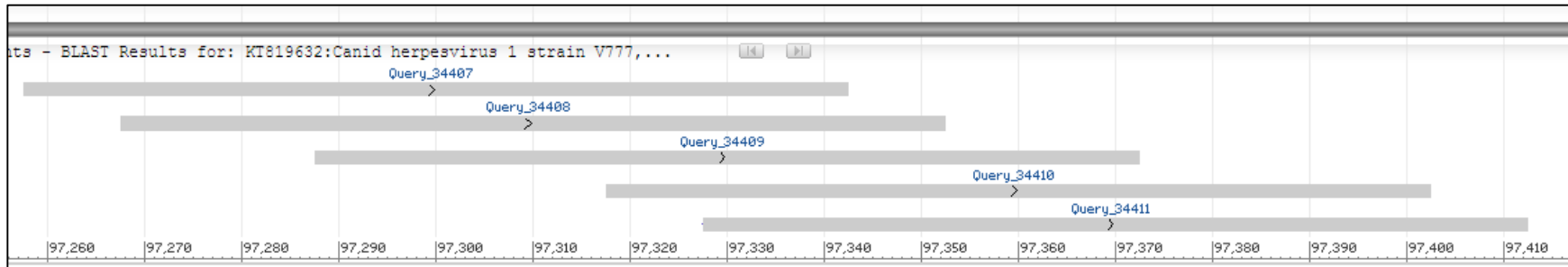


Figura 8.4. Secuencias obtenidas del programa MiREval. **A**, muestra un diagrama general de la disposición de los pre-miARNs obtenidos del programa miREval en relación con la región génica del CHV-1 de donde se obtuvieron. **B**, muestra la región ampliada del recuadro rojo, en la cual se encuentran las secuencias 2-6 en orden descendente.

Posteriormente se eliminaron las secuencias repetidas. Se detectó que la secuencia 14 de miRNAFold, que tiene una longitud de 131 nt, corresponde con la secuencia 2 de miREval, con una longitud de 85 nt; y la secuencia 60 de miRNAFold, de 148 nt, corresponde a la secuencia 25 de miREval. En ambos casos se eliminaron las secuencias de menor longitud, por lo que se conservaron únicamente 14 secuencias entre ambos programas. Para un mejor manejo de las secuencias, éstas se renombraron siguiendo la nomenclatura *chv1-mir-programa-#*, en donde *programa* se refiere al software con el que fue deducido y el símbolo # corresponde al número en los resultados originales. De los 14 pre-miARNs, dos se encuentran en la secuencia opuesta a la región entre los genes RL2 y RS1, uno en el gen RL2 y 11 en el gen RS1. (Tabla 8.4).

Pre-miRNA	Región	Localización (complemento)	Tamaño de la secuencia (nt)
chv1-mir-mireval-6	97328-97412	Entre genes RL2 y RS1	84
chv1-mir-mireval-18	99788-99872	Gen RS1	84
chv1-mir-mirnafold-8	96648-96744	Gen RL2	96
chv1-mir-mirnafold-14	97213-97343	Entre genes RL2 y RS1	130
chv1-mir-mirnafold-22	97921-97998	Gen RS1	77
chv1-mir-mirnafold-25	98102-98182	Gen RS1	80
chv1-mir-mirnafold-32	98439-98553	Gen RS1	114
chv1-mir-mirnafold-37	98848-98946	Gen RS1	98
chv1-mir-mirnafold-39	98989-99126	Gen RS1	137
chv1-mir-mirnafold-47	99504-99611	Gen RS1	107
chv1-mir-mirnafold-55	100051-100168	Gen RS1	117
chv1-mir-mirnafold-60	100379-100526	Gen RS1	147
chv1-mir-mirnafold-77	101285-101433	Gen RS1	148
chv1-mir-mirnafold-79	101485-101602	Gen RS1	117

Búsqueda del grado de conservación

Al comparar los miARNs predichos en la localización putativa del genoma del CHV-1 con todos los miARNs maduros de herpesvirus identificados hasta la fecha se obtuvieron los siguientes resultados.

Tabla 8.5. Alineamientos entre pre-miARNs						
chv1-mir-mirnafold-8						
	Alineamiento		Similitud	Score	E-value	Sentido
ebv-mir-BART7-3p	Query	68 CATCATAGTCC 78	11/11 (100%)	21.1 bits (22)	0.14	+/-
	Sbjct	1 CATCATAGTCC 11				
chv1-mir-mirnafold-77						
	Alineamiento		Similitud	Score	E-value	Sentido
dev-mir-D21-3p	Query	85 GTTGTTTGGAGAATG 99	14/15 (93%)	22.9 bits (24)	0.057	+/-
	Sbjct	22 GTTGTTTGGAGATTG 8				

Tabla 8.6. Localización de los alineamientos coincidentes entre pre-miARNs		
CHV-1 Pre-miRNA	Coincidencia	Localización en el genoma de los herpesvirus
chv1-mir-mirnafold-8	ebv-mir-BART7	Gen LF2
chv1-mir-mirnafold-77	dev-mir-D21	Gen RS1

III. Identificación de posibles productos derivados del gen LAT del CHV-1

Nombre	Sentido	Marco	Inicio	Parada	Longitud (nt/aa)	Similitud con otras proteínas (SmartBlast)
ORF13	-	1	5709	1558	4152/1383	ICP4
ORF14	-	1	1008	1	1008/335	ICP0
ORF7	+	2	956	1330	375/124	-
ORF8	+	2	4307	4585	279/92	AP-1 complex subunit beta-1 isoform X4 (Danio rerio) [Proteína de Pez cebra]
ORF5	+	1	3823	4074	252/83	-
ORF12	-	3	3063	3263	201/66	Proteína hipotética [<i>Pseudomonas syringae</i>]
ORF23	-	2	758	567	192/63	-
ORF3	+	1	2746	2913	168/55	1)Proteína hipotética [<i>Rhodospirellula europea</i>] 2)Proteína hipotética [<i>Desulfobulbus elongatus</i>]
ORF1	+	1	1216	1374	159/52	1)Proteína hipotética [<i>Geobacillus</i> sp] 2)Proteína hipotética [<i>Parageobacillus thermoglucosidasius</i>]
ORF16	-	2	4622	4467	156/51	Fragmento proteína bacteriana
ORF17	-	2	4409	4263	147/48	Fragmento de proteína bacteriana
ORF21	-	2	2810	2679	132/43	-
ORF10	+	3	624	743	120/39	-
ORF6	+	1	4354	4470	117/38	1)Proteína hipotética [<i>Deinococcus gobiensis</i>] 2)Proteína hipotética [<i>Pisolithus microcarpus</i>]
ORF22	-	2	2027	1917	111/36	Fragmentos de Flavin reductasa en múltiples organismos
ORF18	-	2	4241	4134	108/35	Proteína hipotética [<i>Bacteroides fragilis</i>]
ORF20	-	2	3227	3126	102/33	-
ORF4	+	1	2974	3063	90/29	1)Proteína hipotética [<i>Setosphaeria turcica</i>] 2)Proteína hipotética [<i>Plantibacter</i> sp] 3)Producto proteico sin nombrar [<i>Trypanosoma congolense</i>]
ORF19	-	2	3878	3789	90/29	Ribonucleasa dsRNA-específica [<i>Chrysanthemum coronarium</i>]
ORF25	-	2	329	249	81/26	1)Proteína de membrana [<i>Rathayibacter tritici</i>] 2)Proteína hipotética [<i>Paenibacillus polymyxa</i>] 3)Proteína hipotética [<i>Paenibacillus mucilaginosus</i>]
ORF2	+	1	2092	2172	81/26	1)Proteína hipotética [<i>Plasmodium berghei</i>] 2)Proteína hipotética [<i>Tritrichomonas foetus</i>]
ORF15	-	2	5129	5052	78/25	-
ORF11	+	3	1920	1997	78/25	-
ORF9	+	2	5384	5461	78/25	Proteína sin caracterizar [<i>Vibrio cholera</i>]
ORF24	-	2	479	402	78/25	-

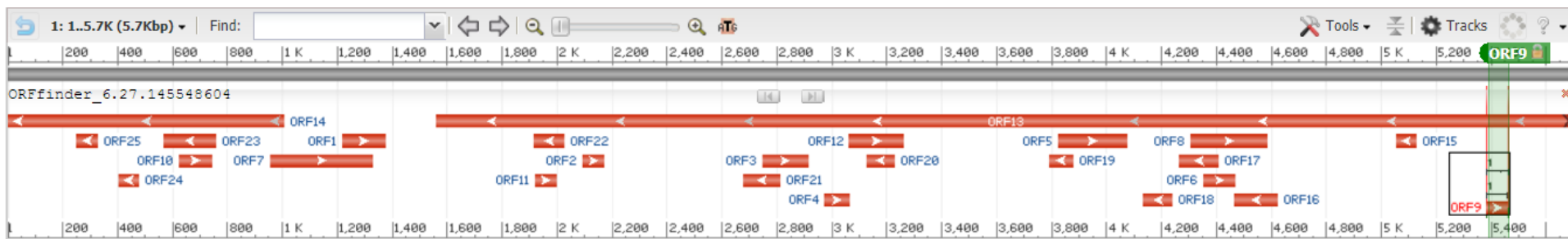


Figura 8.5. Esquema de la localización de los 25 ORFs obtenidos de la secuencia de 5.7 kb utilizada del CHV-1. La franja de color gris oscuro en la parte superior corresponde a la región del genoma analizada del CHV-1. Los fragmentos de color naranja en la parte inferior representan los ORFs predichos por el programa utilizado; las flechas blancas en su interior indican la dirección de la transcripción. ORF14 corresponde al gen RS1 y ORF13 al gen RL2.

Se encontraron 25 ORFs teóricos en la región analizada (Figura 8. 5). En la Tabla 8.7 se muestra el nombre, la secuencia de ADN en la cual se localizó, el marco de lectura de la proteína, la localización del codón de inicio y de parada y la longitud tanto de nucleótidos como de aminoácidos. La última columna también muestra las coincidencias encontradas por medio de la herramienta SmartBlast. En la Tabla 8.8 se muestran a detalle los alineamientos entre los ORFs.

Tabla 8.8. Alineamientos de los péptidos predichos						
	Localización del alineamiento	Score	E-value	Similitud	Positivos	Brecha
ORF7	-	-	-	-	-	-
ORF8	-	-	-	-	-	-
ORF5	-	-	-	-	-	-
ORF12	Query 47 LGISENWRHESYSFVLIH 64 +GI++NW+H +LIH Sbjct 103 IGITQMWKH-----ILIH 115	20.41 bits (41)	0.003	8/18 (44%)	13/18 (72%)	5/18 (27%)
ORF23	-	-	-	-	-	-
ORF3	Query 11 TTDHQTSKFSII 22 T +H+T++FS+I Sbjct 8 TAEHETTRFSVI 19	20.8 bits (42)	6e-04	6/12 (50%)	11/12 (91%)	0/12 (0%)
	Query 9 KRTTDHQTSKFSI 21 K H+TS+F++ Sbjct 12 KTDVAHETSRTV 24	17.3 bits (33)	0.012	5/13 (38%)	9/13 (69%)	0/13 (0%)
ORF1	Query 15 PPRALTFRLFKIRGGFK 31 P LT +FKIRGG + Sbjct 20 SPENLTKDMFKIRGGVR 36	23.1 bits (48)	0.032	9/17 (53%)	11/17 (64%)	0/17 (0%)
	Query 16 PRALTFRLFKIRGGFK 31 P LT +FKIRGG + Sbjct 7 PENLTKDMFKIRGGVR 22	22.7 bits (47)	0.033	9/16 (56%)	11/16 (68%)	0/16 (0%)
ORF16	Query 3 YNMLMAIQLNF 13 Y+NL+A++LN+ Sbjct 366 YLNLLAVELNY 376	21.2 bits (43)	0.049	6/11 (55%)	11/11 (100%)	0/11 (0%)
ORF17	Query 24 MRYLMTLCQYS 34 ++Y++TLC+ S Sbjct 19 LKYMLTLCESS 29	17.7 bits (34)	0.003	5/11 (45%)	10/11 (90%)	0/11 (100%)
ORF21	-	-	-	-	-	-
ORF10	-	-	-	-	-	-
ORF6	Query 15 PSSAIPDSSFRMWVRSR 31 P SA+PDSS + V R Sbjct 28 PPSAVPDSSDQTSVSVR 44	19.2 bits (38)	0.028	9/17 (53%)	11/17 (64%)	0/17 (0%)
	Query 1 MFNTGIIP 8 +FNTGI+P Sbjct 103 LFNTGIVP 110	19.2 bits (38)	0.035	6/8 (75%)	8/8 (100%)	0/8 (0%)
ORF22	Query 28 STWPVVEKH 36 STWPVVE+H Sbjct 72 STWPVVERH 80	25 bits (53)	0.001	8/9 (89%)	9/9 (100%)	0/9 (0%)
	[...]	[...]	[...]	[...]	[...]	[...]
	Query 25 YVPSTWVVEKH 36 ++ ++WV+EK Sbjct 57 FLTTSWVVEKQ 68	20.8 bits (42)	0.034	5/12 (42%)	10/12 (83%)	0/12 (0%)
ORF18	Query 19 HTFVKSLF 26 HTFVK+LF Sbjct 3 HTFVKTLF 10	18.9 bits (37)	0.001	7/8 (88%)	8/8 (100%)	0/8 (0%)
ORF20	-	-	-	-	-	-

ORF4	Query 11 STLGVGSFFWHWSKWSGRL 29 +TLGVG+FF + + L	20.0 bits (40)	0.004	8/19 (42%)	12/19 (63%)	0/19 (0%)
	Sbjct 6 NTLGVGTFFRAYMRQESVL 24					
	Query 8 SSKSTLGVG 16 SSK+TLGVG	18.9 bits (37)	0.012	8/9 (89%)	9/9 (100%)	0/9 (0%)
	Sbjct 76 SSKTTLGVG 84					
	Query 11 STLGVGSFF 19 S++GVGSF+	18.9 bits (37)	0.013	6/9 (67%)	9/9 (100%)	0/9 (0%)
	Sbjct 291 SSMGVGSFY 299					
ORF19	Query 16 LNHIAKPRDLL 26 L+ +AKP+DLL	20.0 bits (40)	1e-04	7/11 (64%)	10/11 (90%)	0/11 (0%)
	Sbjct 27 LSKVAKPKDLL 37					
ORF25	Query 11 PWIQLLIL 18 PW+QSL+L	18.9 bits (37)	0.011	6/8 (75%)	8/8 (100%)	0/8 (0%)
	Sbjct 37 PWVQSLVL 44					
	Query 12 WIQSLILLVLYVLM 26 W + +LVLY+L++	18.1 bits (35)	0.021	6/15 (40%)	11/15 (73%)	0/15 (0%)
	Sbjct 13 WTSTAAILVLYILLV 27					
	Query 5 MMMKTPWIQSLILLVLYVLM 26 M +K + + ++LVLY+L++	17.7 bits (34)	0.030	7/22 (32%)	15/22 (68%)	0/22 (0%)
	Sbjct 1 MSCVKGYTSTGVILVLYILLV 22					
ORF2	Query 7 IKRNNSSFTRGCFNSVAYI 25 IK+NN++F S +YI	16.2 bits (30)	0.021	8/19 (42%)	12/19 (63%)	0/19 (0%)
	Sbjct 36 IKKNNTTFDAFFHVSSSYI 54					
	Query 9 RNNSSFTRGC 18 RNN+S+F+R	15.8 bits (29)	0.028	6/10 (60%)	8/10 (80%)	0/10 (0%)
	Sbjct 114 RNNSTFSRDS 123					
ORF15	-	-	-	-	-	-
ORF11	-	-	-	-	-	-
ORF9	Query 1 MSLIDLRLSPR 11 +SLID+R++ R	18.1 bits (35)	3e-04	6/11 (55%)	10/11 (90%)	0/11 (0%)
	Sbjct 15 LSLIDMRMNR 25					
ORF24	-	-	-	-	-	-

9. DISCUSIÓN

I. Comparación de la similitud en la región génica relacionada con la Latencia en los Herpesvirus

Como primer paso para responder a la pregunta planteada en el presente trabajo se comparó la región del genoma en la que se ha identificado al gen LAT en otros herpesvirus con la región análoga del CHV-1. Los resultados muestran que las similitudes de estas regiones son muy bajas entre los herpesvirus analizados por lo que no es posible deducir la presencia del gen LAT en el herpesvirus canino tipo 1 únicamente en base a la similitud secuencial.

Para analizar los datos obtenidos es necesario tener en cuenta el significado del *e-value* y del *Score* o Puntaje. El *e-value* es un parámetro que describe el número de coincidencias que pueden esperar verse debido al azar al analizar una base de datos. Su valor disminuye exponencialmente al aumentar el valor del Puntaje. Entre más bajo el *e-value*, o más cercano a cero, la coincidencia es más significativa. En el caso de secuencias cortas el *e-value* es relativamente elevado debido a que en estas secuencias las coincidencias tienen una mayor probabilidad de ocurrir por azar.

Entre la región que se encuentra activa durante la latencia en el genoma del HSV-1, en la cual se localiza el gen LAT, y la región análoga en el genoma del CHV-1 se localiza una sección de 12 nt que coincide en un cien por ciento. Sin embargo, el alineamiento se localiza dentro de la secuencia complementaria al gen RS1 del CHV-1 y al gen RL2 del HSV-1 por lo que la sección coincidente se localiza en dos regiones diferentes. Adicionalmente, los valores probabilísticos (*e-value* y puntaje) son sugerentes de que la coincidencia no tiene una relación biológica.

Entre el gen LAT del BoHV-1 y la secuencia complementaria a los genes RL2 y RS1 (localización putativa del gen LAT) del CHV-1 se localiza una sección coincidente al cien por ciento de 11 nt. No obstante, esta similitud abarca dos regiones génicas diferentes, ya que la sección coincidente del BoHV-1 corresponde a una región complementaria del gen RL2 y al gen RS1 en el CHV-1. Debido a los valores probabilísticos obtenidos se puede considerar que la similitud es producto del azar, por lo que no es relevante.

Entre las regiones análogas del SuHV-1 y el CHV-1 hay nueve alineamientos de una extensión de 12 a 13 nt de longitud. Aunque ocho de estos alineamientos coinciden en un cien por ciento, los valores probabilísticos sugieren que las similitudes entre las regiones comparadas entre ambos virus no tienen una significancia real y que probablemente son producto del azar. La comparación entre las regiones análogas del CHV-1 y el FeHV-1 muestra nueve alineamientos, seis de los cuales no tienen importancia biológica, ya que sus valores probabilísticos

sugieren que son coincidencias producto del azar. De las tres restantes, la primera tiene una extensión de 1125 nt, con una coincidencia del 63% entre ambas secuencias, que corresponden a la secuencia complementaria al gen RS1. La segunda tiene una extensión de 476 nt con una coincidencia del 67%, en la región complementaria al gen RS1; y el tercer alineamiento significativo tiene una extensión de 195 nt con una similitud del 65% entre ambas secuencias, pertenecientes a la secuencia complementaria al gen RL2. A pesar de la longitud y de la clara relación biológica de los alineamientos, las regiones analizadas de ambos virus no pueden considerarse homólogas ya que para ello al menos el 70% de la totalidad de los nucleótidos deben ser similares. No obstante, las porciones coincidentes de las regiones analizadas parecen indicar que dichas regiones particulares se encuentran conservadas en ambos virus.

De los cuatro alineamientos obtenidos al comparar las regiones análogas entre el EHV-1 y el CHV-1, el primero muestra una extensión de 519 nt con una similitud del 67%, y unos valores probabilísticos que permiten considerar que la relación entre ambas secuencias no es producto del azar.

En los últimos dos herpesvirus las regiones con significancia biológica (#1 y 2 en el FeHV-1, y #1 en el EHV-1) pertenecen a porciones complementarias al gen RS1, en cuya secuencia opuesta se han localizado LATs. Sin embargo, debido a que la similitud entre los genes estudiados y comparados no permite considerar que exista homología –ya que en ninguno de los casos existe una similitud mayor al 30% con respecto al CHV-1- no es posible extrapolar únicamente con esta información la presencia del gen LAT en el genoma del CHV-1 en ésta región particular.

Es posible que la falta de más alineamientos visibles se deba a la restricción de los parámetros del análisis ya que se utilizó un *Word Size* de 11 y se omitieron las secuencias repetidas por lo que puede haber otras coincidencias de menor longitud y de baja complejidad que fueron ignoradas.

La comparación de las secuencias entre las regiones génicas relacionadas con la latencia en los Herpesvirus arrojó similitudes bajas. Entre el CHV-1 y el HSV-1 se observa una similitud del 6.5% respecto al gen RL2 y de 20.5% con el gen RS1. Las similitudes con el BoHV-1 fueron de 18.3% y 18.6%; con el SuHV-1 fueron de 14.9% y 18%; con el FeHV-1 fueron de 15.3% y 23.1%; y con el EHV-1 fueron de 14% y 20% respectivamente. Estas similitudes bajas, por tanto, no permiten considerar que la función del gen LAT este dada por la conservación de regiones dentro de los genes. Sin embargo, en todos los herpesvirus utilizados en el análisis se ha identificado una región homóloga que se encuentra activa durante la latencia (HSV, Farrel *et al.*, 1991; BoHV-1, Jones, 2003; SuHV-1, Cheung, 1991; EHV-1, Baxi *et al.*, 1995; Chesters *et al.*, 1997; FeHV-1, Townsend *et al.*, 2004)

La literatura sobre el gen LAT de los Herpesvirus se ha incrementado en los últimos años, sin embargo hay pocos estudios que comparen directamente la secuencia de éste gen entre diferentes especies de virus.

Existen estudios que han comparado las similitudes funcionales entre estos genes y sus transcritos pero se limitan a unos cuantos virus –incluyendo HSV-1 y 2, BoHV-1 y 5 y SuHV-1-.

Al comparar la secuencia de nucleótidos entre el HSV-1 y el HSV-2, Krause *et al.* (1991) encontraron que ambos genes LAT tenían una organización general similar pero únicamente compartían una similitud secuencial de manera focal. Estas diferencias entre ambos genes podrían ser un factor determinante en el comportamiento distinto durante el establecimiento de la latencia en ambos virus, particularmente la selección de poblaciones neuronales diferentes (Margolis *et al.*, 2007)

Mott *et al.* (2003) probaron que al insertar el gen LR del BoHV-1 en la región correspondiente al gen LAT en cepas de HSV-1 LAT⁻ la capacidad de reactivación viral del HSV-1 se restablece a niveles casi normales, lo que sugiere que la funcionalidad del gen LAT no depende de su similitud secuencial. Sin embargo, Perng *et al.* (2002) demostraron no solo que la capacidad de reactivación es similar sino que las cepas quiméricas tienen una virulencia aumentada, lo que parece indicar que aunque los genes LAT de diferentes herpesvirus cumplen una función general similar entre sí, el mismo gen en cada especie viral posee funciones adicionales particulares que contribuyen al comportamiento patogénico variable de los diferentes Herpesvirus.

En el caso de los tipos 1 y 5 del BoHV-1, el gen LR de ambos muestra características similares en cuanto a la ubicación y a la funcionalidad, sin embargo el tipo 5 muestra omisiones en las secuencias de los promotores específicos de neuronas, lo que también sugiere los distintos tipos de células afectadas durante la latencia (Silvestro & Bratanich, 2016).

Es interesante mencionar el hecho de que los *Varicellovirus* utilizados en este análisis tienen genes análogos al gen LAT del HSV-1, el herpesvirus prototípico de la subfamilia *Simplexvirus*. En cambio, el principal *Varicellovirus*, el Herpesvirus humano 3 o Virus de Varicella-Zóster no posee genes análogos al LAT. El VZV expresa durante la latencia cinco proteínas de su fase lítica (ORF4, ORF21, ORF29, ORF62 y ORF63) (Grinfield & Kennedy, 2004; Mori & Nishiyama, 2005).

En todos los Herpesvirus cuyo genoma codifica al gen LAT se ha demostrado su papel en el establecimiento y reactivación de la Latencia por medio de funciones específicas que recién empiezan a ser comprendidas. Sin embargo, y como se ha mostrado en este trabajo, el gen LAT no posee una similitud secuencial uniforme, por lo que puede sugerirse que la funcionalidad durante la Latencia de éste gen no depende de una estructura en común. Esto se puede deber a que los transcritos derivados de estos genes cumplen un papel de interferencia y regulación sobre otros genes del mismo virus.

Como corolario es necesario hacer la aclaración de que aunque está fuera de duda la región que es transcripcionalmente activa, los límites de ésta únicamente están determinados en el Herpesvirus Simplex tipo 1,

el Herpesvirus Bovino tipo 1 y el Herpesvirus Porcino tipo 1. Tanto en el Herpesvirus Felino tipo 1 (Ohmura *et al.*, 1993; Townsend *et al.*, 2004) como en el Herpesvirus equino tipo 1 (Baxi *et al.*, 1995) y tipo 4 (Borchers *et al.*, 1999) se han identificado y aislado transcriptos asociados a la latencia, por lo que la región génica está identificada, sin embargo, a diferencia de los otros herpesvirus utilizados en este estudio, el gen LAT no está secuenciado y por tanto se desconocen sus límites precisos. Por lo tanto, la secuencia utilizada de los genes LAT putativos del Herpesvirus Felino tipo 1 y Herpesvirus Equino tipo 1 corresponden a la secuencia complementaria de los genes RS1 y RL2.

II. Identificación de microARNs derivados de la localización putativa del gen LAT en CHV-1

Debido a que la existencia del gen LAT en el CHV-1 no pudo demostrarse por medio de la homología estructural entre los diferentes herpesvirus analizados, fue necesario emplear otra estrategia para tratar de resolver el problema. Por ello, se decidió escanear la región putativa del gen LAT en éste virus para localizar miARNs, que se sabe están estrechamente relacionados con el gen LAT en otros herpesvirus.

Al analizar la localización putativa del gen LAT en el CHV-1 –en la secuencia complementaria y sobrepuesta a los genes RS1 y RL2- se localizaron 14 secuencias sugestivas de ser precursoras de microARNs (pre-miARNs). Para investigar si las secuencias predichas se encontraban conservadas, cada uno de los 14 miARNs se compararon con todos los miARNs maduros encontrados en otros herpesvirus. No obstante, es necesario recalcar que aunque la localización de los miARNs en el genoma de virus estrechamente relacionados está conservada, difícilmente hay conservación a nivel de secuencia entre miARNs de origen viral (Sorel & Dewals, 2016). La comparación arrojó que el miARN predicho *chv1-mir-mirnafold-8* tiene similitud con el miARN *ebv-mir-BART7-3p*, del Virus de Epstein-Barr (EBV). Sin embargo, el *chv1-mir-mirnafold-8* se deriva del gen RL2 en el CHV-1, mientras que el *ebv-mir-BART7-3p* está codificado en el gen LF2 de EBV. Aunque la proteína LF2 tiene un papel en la inhibición de la replicación viral y por tanto juega un papel en el establecimiento de la latencia (Calderwood *et al.*, 2008), el mecanismo de ésta es completamente diferente a la de los Alphaherpesvirus debido a que el EBV, al ser un Gammaherpesvirus, no posee el gen LAT ni otros genes relacionados, como ICP4 o ICP0 (Kempkes & Robertson, 2015).

La predicción bioinformática de miARNs en los herpesvirus ha sido explorada por otros autores. Pfeffer *et al.* (2005) utilizaron un método computacional combinado con la clonación molecular para predecir y detectar la presencia de miARNs en varios miembros de la familia Herpesviridae. Estos autores predijeron la existencia de por lo menos ocho miARNs en el genoma del HSV-1, aunque no fueron validados ni clonados en ese estudio. Sin

embargo, Cui *et al.* (2006) volvieron a utilizar una aproximación bioinformática para predecir y encontrar 11 miARNs, de los cuales lograron identificar uno por medio de hibridación.

Glazov *et al.* (2010) por medio de análisis bioinformático y de Northern Blot identificaron diez microARNs en el genoma del BoHV-1, de los cuales uno se encuentra codificado en el gen LR. Además, llevaron a cabo una comparación con los genomas de otros *Varicellovirus* para identificar secuencias similares que pudiesen arrojar datos sobre el grado de conservación de los miARNs del BoHV-1. Únicamente se encontraron nueve secuencias que mostraron una identidad variable con el genoma del BoHV-5. Este último hallazgo fue puesto en duda por Tang *et al.* (2014) quienes encontraron solo un miARN conservado en ambos virus, el cual no estaba relacionado con el gen LR en el genoma del BoHV-5. Estos resultados aparentemente contradictorios se explican porque en el primer estudio únicamente se llevó a cabo la predicción computacional de las secuencias, mientras que el segundo trabajo también realizó la identificación de los miARNs expresados en células infectadas.

Burnside *et al.* (2006) encontraron ocho miARNs en el genoma del GaHV-2 de los cuales tres se localizan en el gen LAT. Utilizando únicamente predicción por computadora, Xiang *et al.* (2012) encontraron 12 miARNs codificados a lo largo del genoma del Herpesvirus de Anátidos tipo 1 (AHV-1), de los cuales seis se encuentran en una región similar al gen LAT en los *Varicellovirus*. Dentro de los miARNs encontrados dos están conservados en el genoma del GaHV-2

Estos estudios demuestran que la predicción bioinformática de miARNs es una herramienta válida pero incompleta, ya que es necesario comprobar que éstos sean expresados por medio de procedimientos experimentales, tal y como mostraron Umbach *et al.* (2008), quienes por medio de expresión por plásmidos obtuvieron seis secuencias y por aislamiento desde células infectadas obtuvieron tres de las secuencias anteriores y una nueva. Wu *et al.* (2012) descubrieron que el gen LLT del SuHV-1 es un precursor que codifica 11 miARNs distintos en células epiteliales infectadas, hallazgo que se vio confirmado por Liu *et al.* (2016), quienes además encontraron miARNs dentro de ORFs ajenos a la región LLT y en las regiones IRS y TRS del genoma. Como se ve a través de estos trabajos, ni siquiera a través de experimentos es posible realizar una identificación infalible, ya que las condiciones en que los miARNs se expresan varían en los diferentes ambientes en que se lleve a cabo la manipulación.

Como se mencionó anteriormente, la secuencia de los miARNs no está muy conservada aun entre virus estrechamente relacionados. En el caso del BoHV, Tang *et al.* (2013) descubrieron que el BoHV-5 únicamente tiene un miARN conservado con el BoHV-1. Entre los virus HSV-1 y HSV-2 se encuentran conservados nueve miARNs, la mayoría en la región relacionada a la latencia (Jurak *et al.*, 2010). En el caso de los virus EHV-1, 4 y FeHV-1 no se han detectado hasta el momento miARNs codificados en su genoma.

III. Identificación de posibles productos derivados del gen LAT putativo del CHV-1

Se encontraron 25 ORFs en la región putativa del gen LAT en el genoma del CHV-1 con una longitud de 25 a 124 aminoácidos. De éstos, dos corresponden a los genes en la secuencia complementaria, por lo que no son tomados en consideración. Del resto, algunos muestran similitudes puntuales con proteínas que no están relacionadas con la latencia o con proteínas virales. Estas coincidencias encontradas se explican debido a similitudes azarosas que no tienen relevancia alguna para el presente trabajo. Los ORFs encontrados tampoco muestran ninguna relación con los ORFs relacionados a la latencia del BoHV-1. Esto parece indicar dos posibles escenarios; primero, que de manera similar a otros *Varicellovirus*, el CHV-1 no expresa proteínas durante la latencia, y que el control de ésta recae directamente en los transcriptos y en los miARNs; y segundo, que es posible que las proteínas se expresen en determinadas circunstancias específicas, por lo que son difíciles de identificar, haciendo necesario que, si existen, sean identificadas experimentalmente y después analizadas a profundidad por medios bioinformáticos.

Aunque es innegable la presencia de genes relacionados con la latencia dentro de la familia Herpesviridae, la función de éstos parece recaer directamente en los transcriptos y no en las proteínas ya que han sido pocos los casos en que éstas han podido ser identificadas. De todos los herpesvirus estudiados, únicamente se han identificado ORFs derivados del gen LAT en el HSV-1 y -2 y en el BoHV-1 y BoHV-5.

Wechsler *et al.* (1989) identificaron en el gen LAT del HSV-1 tres ORFs de 274, 108 y 174 aminoácidos, sin embargo estudios posteriores han sido incapaces de aislar las proteínas derivadas de esta región. Thomas *et al.* (1999) identificaron una proteína derivada del gen LAT y sugieren que ésta se encuentra estrictamente regulada y que es por lo tanto difícil de detectar. Ésta proteína potencialmente expresada incrementa la activación de los genes líticos, por lo que puede cumplir un papel relevante durante la reactivación del virus desde la latencia. Thomas *et al.* (2002) sugieren que la proteína identificada previamente cumple un papel de sustitución de la proteína ICP0 en su rol de activación de otros genes líticos, por lo que la expresión de la proteína derivada del gen LAT no es constante ya que únicamente está activa cuando hay una represión de los genes IE.

Doerig *et al.* (1991) detectaron un antígeno viral presente en neuronas latentemente infectadas con HSV-1 *in vitro* 1 que no está presente en neuronas infectadas productivamente o en neuronas infectadas con virus mutantes sin el gen LAT, lo que también parece sugerir la presencia de algún producto proteico codificado en el gen LAT. Carpenter *et al.* (2008) mostraron que al modificar los codones de inicio de los ORFs codificados en la región del LAT se altera significativamente la actividad antiapoptótica del LAT en cultivo celular, lo que demuestra de forma indirecta que los ORFs tienen una función dentro del ciclo de reactivación al alterar los niveles de apoptosis.

Sin embargo, otros autores han mostrado pruebas que ponen en entredicho que el gen LAT del HSV-1 codifique para proteínas. Drolet *et al.* (1998) compararon las secuencias del gen LAT de diferentes cepas de HSV-1 y hallaron que ninguno de los ORFs se encontraba conservado, por lo que no es posible afirmar que esta región codifica para una proteína esencial para la reactivación, aunado al hecho de que todas las cepas analizadas tenían un nivel similar de reactivación. No obstante, esto puede sugerir que es posible que las proteínas expresadas por cada herpesvirus no compartan una secuencia análoga, y que aun así cumplan funciones similares. Fareed & Spivack (1994) analizaron el nivel de reactivación del HSV-1 al modificar la sección del LAT en donde se encuentran los ORFs y encontraron que ninguno de los ORFs alterados es necesario para la reactivación del virus, lo que no necesariamente niega la existencia de estos productos, pero si muestra en cierta manera que no son indispensables y que su función pueda ser sustituida por transcriptos, que no despiertan una respuesta inmune por parte del huésped, lo que es esencial para definir una infección latente. Esto parece apoyar la hipótesis de que el control ejercido por el gen LAT en la latencia esta mediado por los transcriptos y no por péptidos.

En cuanto al BoHV-1, originalmente se descubrieron dos ORFs codificados en el gen LR por medio de herramientas bioinformáticas (Kutish *et al.*, 1990) y se sugirió que era posible que ambos ORFs sintetizaran un único péptido a través de un *splice* entre ambos. Posteriormente Hossain *et al.* (1995) reconocieron experimentalmente la existencia de un péptido de 41 kD sintetizado por el ORF2 (Ruiz *et al.*, 2008). Finalmente Jones *et al.* (2006) descubrieron la existencia de un tercer ORF, llamado ORF-E que se localiza en la región promotora del gen LR y aunque es necesario para regular la reactivación de la latencia junto con los transcritos, su función específica aun es desconocida. Al ser el BoHV el único herpesvirus en el que se ha confirmado la expresión de proteínas relacionadas con el control de la latencia es difícil extrapolar la información en otros virus que únicamente dependen de transcriptos, por lo que la identificación de ORFs en el gen putativo del CHV-1 por medio de herramientas bioinformáticas solo es un primer paso en el proceso, ya que es necesario encontrar las proteínas por medio de técnicas experimentales.

10. CONCLUSIONES

- No fue posible confirmar la presencia del gen LAT en el Herpesvirus Canino tipo 1 en base a la secuencia de nucleótidos, ya que a pesar de que los herpesvirus poseen un gen LAT en una localización genómica análoga la funcionalidad de éste no depende de la homología de su secuencia en este caso.
- Los microARNs predichos por medio de programas bioinformáticos cumplieron los requisitos teóricos de éstas moléculas, sin embargo al no tener un grado de conservación en otros herpesvirus su expresión por parte del virus durante la latencia no puede ser confirmada, ya que es necesario identificarlos por medio de pruebas experimentales.
- Debido a que no puede generalizarse la presencia de ORFs derivados de la región relacionada con la latencia en los Herpesvirus, su presencia como parte del complejo mecanismo de regulación en el Herpesvirus Canino no pudo ser descartada.
- En base a los resultados obtenidos no es posible confirmar ni negar que el Herpesvirus Canino posee el gen LAT, sin embargo en este trabajo se sientan las primeras bases para su identificación por medios experimentales, en particular los microARNs codificados y expresados por el gen LAT durante la latencia de este virus.

11. PERSPECTIVAS

Este trabajo es un primer acercamiento en el largo camino para desentrañar los complejos mecanismos moleculares y celulares que regulan el ciclo de vida del Herpesvirus Canino. Sin embargo, un paso fundamental para aproximarse al problema es la secuenciación de las cepas virales presentes en nuestro país, para que se lleve a cabo un análisis filogenético completo y una determinación de la homología con las cepas cuya secuencia se encuentra disponible. O, en su defecto, secuenciar la región análoga que se utilizó en este trabajo. Una vez que se tenga disponible esa información, el análisis del virus puede tomar varios caminos: 1) infectar células, fomentar el establecimiento de la latencia en ellas y aislar el ARN que se exprese para buscar los microARNs predichos en este estudio y así confirmar o desechar esta hipótesis; 2) utilizar vectores de expresión para analizar los productos derivados de esa región genómica; 3) utilizando el proceso anterior, tipificar los productos proteicos que se expresen durante la latencia, para conocer si este virus sigue el patrón de expresión de otros *Varicellovirus* o, en cambio, manifiesta un mecanismo similar al del Virus de Varicella-Zoster.

12. BIBLIOGRAFIA

1. Agelidis AM, Shukla, D. *Cell entry mechanisms: what we have learned in recent years*. *Future Virology* 2015; 10: 1145-1154.
2. Atanasiu D, Saw TW, Cohen GH, Eisenberg RJ. *Cascade of Events Governing Cell-Cell Fusion Induced by Herpes Simplex Virus Glycoproteins gD, gH/gL, and gB*. *Journal of Virology* 2010; 84: 12292-12299.
3. Baxi MK, Efstathiou S, Lawrence G, Whalley JM, Slater JD, Field HJ. *The detection of latency-associated Transcripts of equine herpesvirus 1 in ganglionic neurons*. *Journal of General Virology* 1995; 76: 3113-3118.
4. Boehmer PF, Lehman IR. *Herpes Simplex Virus DNA Replication*. *Annual Review of Biochemistry* 1997; 66: 347-384.
5. Borchers K, Wolfinger U, Ludwig H. *Latency-associated Transcripts of equine herpesvirus type 4 in trigeminal ganglia of naturally infected horses*. *Journal of General Virology* 1999; 80: 2165-2171.
6. Bowman BR, Baker ML, Rixon FJ, Chiu W, Quioco FA. (2003). *Structure of the herpesvirus major capsid protein*. *The Embo Journal* 2003; 22: 757-765.
7. Brown AC, Nair V, Allday MJ. *Epigenetic Regulation of the Latency-Associated Region of Marek's Disease Virus in Tumor-Derived T-Cell Lines and Primary Lymphoma*. *Journal of Virology* 2012; 86: 1683-1695.
8. Brown JC, Newcomb WW. *Herpesvirus Capsid Assembly: Insights from Structural Analysis*. *Current Opinion in Virology* 2011; 1: 142-149.
9. Burnside J, Bernberg E, Anderson A, Lu C, Meyers BC, Green PJ, Jain N, Isaacs G, Morgan RW. *Marek's Disease Virus Encodes MicroRNAs That Map to meq and the Latency-Associated Transcript*. *Journal of Virology* 2006; 80: 8778-8786.
10. Burr PD, Campbell MEM, Nicolson L, Onions DE. *Detection of Canine Hepresvirus 1 in a wide range of tissues using the polymerase chain reaction*. *Veterinary Microbiology* 1996; 53: 227-237.
11. Byrne KM, Horohov DW, Kousoulas KG. *Glycoprotein B of Bovine Herpesvirus-1 Binds Heparin*. *Virology* 1995; 209: 230-235.
12. Calderwood MA, Holthaus AM, Johannsen E. *The Epstein-Barr Virus LF2 Protein Inhibits Viral Replication*. *Journal of Virology* 2008; 82: 8509-8519.
13. Campadelli-Fiume G, Masio M, Avitabile E, Cerretani A, Forguieri C, Gianni T, Menotti L. *The multipartite system that mediates entry of herpes simplex virus into the cell*. *Reviews in Medical Virology* 2007; 17: 313-326.

14. Carpenter D, Henderson G, Hsiang C, Osorio N, BenMohamed L, Jones C, Wechsler SL. *Introducing point mutations into the ATGs of the putative open Reading frames of the HSV-1 gene encoding the latency Associated transcript (LAT) reduces its anti-apoptosis activity.* Microbial Pathogenesis 2008; 44: 98-102.
15. Carrasco L, Almendral del Río, JM. *Virus Patógenos.* España: Ed. Hélice, 2006.
16. Chen J, Wang X, Liu B. *iMiRNA-SSF: Improving the Identification of MicroRNA Precursors by Combining Negative Sets with Different Distributions.* Scientific Reports 2016; 6: 19062. DOI: 10.1038/srep19062.
17. Cheng RH, Miyamura T. *Structure-based Study of Viral Replication.* Singapore: Ed. World Scientific, 2008.
18. Chesters PM, Allsop R, Purewal A, Edington N. *Detection of Latency-Associated Transcripts of Equid Herpesvirus 1 in Equine Leukocytes but Not in Trigeminal Ganglia.* Journal of Virology 1997; 71: 3437-3443.
19. Cheung AK. *Cloning of the Latency Gene and the Early Protein 0 Gene of Pseudorabies Virus.* Journal of Virology 1991; 65: 5260-5271.
20. Choppin PW, Scheid A. (1980). *The Role of Viral Glycoproteins in Adsorption, Penetration, and Pathogenicity of Viruses.* Reviews of Infectious Diseases 1980; 2: 40-61.
21. Claverie J-M & Notredame C. *Bioinformatics for Dummies.* 2^o Ed. USA: Ed. Wiley Publishing, 2007.
22. Cohrs RJ, Gilden D. *Alphaherpesvirus Latency.* Journal of Neurovirology 2011; 17: 509-511.
23. Cohrs RJ, Gilden DH. *Human Herpesvirus Latency.* Brain Pathology 2001; 11: 465-474.
24. Cui C, Griffiths A, Li G, Silva LM, Kramer MF, Gaasterland T, Wang X-J, Coen DM. *Prediction and Identification of Herpes Simplex Virus 1-Encoded MicroRNAs.* Journal of Virology 2006; 80: 5499-5508.
25. Cullen BR. *Herpesvirus microRNAs: Phenotypes and functions.* Current Opinion in Virology 2011; 1: 211-215.
26. Davison AJ, Eberle R, Ehlers B, Hayward GS, McGeoch DJ, Minson AC, Pellet PE, Roizman B, Studdert MJ, Thiry E. *The Order Herpesvirales.* Archives of Virology 2009; 154: 171-177.
27. Davison AJ. *Chapter 1. Overview of classification.* En: Arvin A, Campadelli-Fiume G, Mocarski E, Moore PS, Roizman B, Whitley R, Yamanishi K. *Human Herpesviruses. Biology, Therapy and Immunoprophylaxis.* USA: Ed. Cambridge University Press, 2007.
28. Davison AJ. *Chapter 2. Comparative analysis of the genomes.* En: Arvin A, Campadelli-Fiume G, Mocarski E, Moore PS, Roizman B, Whitley R, Yamanishi K. *Human Herpesviruses. Biology, Therapy and Immunoprophylaxis.* USA: Ed. Cambridge University Press, 2007a
29. Davison AJ. *Herpesviruses: General Features.* En: Mahy BWJ, Van Regenmortel MHV, editores. *Encyclopedia of Virology.* 3^o Ed. USA: Ed. Elsevier, 2008.

30. Deng Z, Wang Z, Lieberman PM. *Telomeres and viruses: common themes of genome maintenance*. *Frontiers in Oncology* 2012; 2: Disponible en web: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fonc.2012.00201/full> Consultado 17 de Octubre 2017.
31. Deshmane SL, Fraser NW. *During Latency, Herpes Simplex Virus Type 1 DNA is Associated with Nucleosomes in a Chromatin Structure*. *Journal of Virology* 1989; 63: 943-947.
32. Doerig C, Pizer LI, Wilcox CL. *An Antigen Encoded by the Latency-Associated Transcript in Neuronal Cell Cultures Latently Infected with Herpes Simplex Virus Type 1*. *Journal of Virology* 1991; 65: 2724-2727.
33. Döhner K, Wolfstein A, Prank U, Echeverri C, Dujardin D, Vallee R, Sodeik B. *Function of Dynein and Dynactin in Herpes Simplex Virus Capsid Transport*. *Molecular Biology of the Cell* 2002; 13: 2795-2809.
34. Drolet BS, Perng GC, Cohen J, Slanina SM, Yukht A, Nesburn AB, Wechsler SL. *The Region of the Herpes Simplex Virus Type 1 LAT Gene Involved in Spontaneous Reactivation Does Not Encode a Functional Protein*. *Virology* 1998; 242: 221-232.
35. Fareed MU & Spivack JG. *Two Open Reading Frames (ORF1 and ORF2) within the 2.0-Kilobase Latency-Associated Transcript of Herpes Simplex Virus Type 1 Are Not Essential for Reactivation from Latency*. *Journal of Virology* 1994; 68: 8071-8081.
36. Farrel MJ, Dobson AT, Feldman LT. *Herpes simplex virus latency-associated transcript is a stable intron*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1991; 88: 790-794.
37. Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, Desselberg U, Ball LA. *Virus Taxonomy. Classification and Nomenclature of Viruses. Eight Report of the International Committee on the Taxonomy of Viruses*. USA: Ed, Elsevier Academic Press, 2005.
38. Franco ML, Cediel JF, Payán C. *Breve historia de la bioinformática*. *Colombia Médica* 2008; 39: 117-120.
39. Gao D, Middleton R, Rasko JE, Ritchie W. *miREval 2.0: a web tool for simple microRNA prediction in genome sequences*. *Bioinformatics* 2013; 29: 3225-3226.
40. Gaskell R, Willoughby K. *Herpesviruses of carnivores*. *Veterinary Microbiology* 1999; 69: 73-78.
41. Gkirtzou K, Tsamardinos I, Tsakalides P, Poirazi P. *MatureBayes: A Probabilistic Algorithm for Identifying the Mature miRNA within Novel Precursors*. *PLoS ONE* 2010; 5: e11843. doi: 10.1371/journal.pone.0011843
42. Glazov EA, Horwood PF, Assavalapsakul W, Kongsuwan K, Mitchell RW, Mitter N, Mahony TJ. *Characterization of microRNAs encoded by the bovine herpesvirus 1 genome*. *Journal of General Virology* 2010; 91: 32-41.

43. Grey F, Hook L, Nelson J. *The functions of herpesvirus-encoded microRNAs*. Medical Microbiology and Immunology 2008; 197: 261-267.
44. Grinfeld E, Kennedy PG. *Translation of varicella-zoster virus genes during human ganglionic Latency*. Virus Genes 2004; 29: 317-319.
45. Grünewald K, Desai P, Winkler DC, Heymann JB, Belnap DM, Baumeister W, Steven AC. *Three-Dimensional Structure of Herpes Simplex Virus from Cryo-Electron Tomography*. Science 2003; 302: 1396-1398.
46. Haanes EJ, Tomlinson CC. *Genomic organization of the canine herpesvirus US region*. Virus Research 1998; 53: 151-162.
47. Hay J, Ruyechan WT. *Chapter 10: Alphaherpesvirus DNA Replication*. En: Arvin A; Campadelli-Fiume G, Mocarski E, Moore PS, Roizman B, Whitley R, Yamanishi K. *Human Herpesviruses. Biology, Therapy and Immunoprophylaxis*. USA: Ed, Cambridge University Press, 2007.
48. Heldwein EE, Krummenacher C. *Entry of herpesviruses into mammalian cells*. Cellular and Molecular Life Sciences 2008; 65: 1653-1668.
49. Herold B, WuDunn D, Soltys N, Spear PG. *Glycoprotein C of Herpes Simplex Virus Type 1 Plays a Principal Role in the Adsorption of Virus to Cells and in Infectivity*. Journal of Virology 1991; 65: 1090-1098.
50. Hossain A, Schang LM, Jones C. *Identification of Gene Products Encoded by the latency-related gene of Bovine Herpesvirus 1*. Journal of Virology 1995; 69: 5345-5352
51. Jacquet A, Haumont M, Chellun D, Massaer M, Tufaro F, Bollen A, Jacobs P. *The varicella zoster virus glycoprotein B (gB) plays a role in virus binding to cell surface heparan sulfate proteoglycans*. Virus Research 1998; 53: 197-207.
52. Jones C, Geiser V, Henderson G, Jiang Y, Meyer F, Perez S, Zhang Y. *Functional analysis of bovine herepsvirus 1 (BHV-1) genes expressed during latency*. Veterinary Microbiology 2006; 113: 199-210.
53. Jones C. *Alphaherpesvirus Latency: Its Role in Disease and Survival of the Virus in Nature*. Advances in Virus Research 1999; 51: 81-133.
54. Jones C. *Herpes Simplex Virus Type 1 and Bovine Herpesvirus 1 Latency*. Clinical Microbiology Reviews 2003; 16: 79-95.
55. Jurak I, Kramer MF, Mellor JC, Van Lint AL, Roth FP, Knipe DM, Coen DM. *Numerous Conserved and Divergent MicroRNAs Expressed by Herpes Simplex Viruses 1 and 2*. Journal of Virology 2010; 84: 4659-4672.
56. Kelly BJ, Fraefel C, Cunningham AL, Diefenbach RJ. *Functional roles of the tegument proteins of herpes simplex virus type 1*. Virus Research 2009; 145: 173-186.

57. Kempkes B & Robertson ES. *Epstein-Barr virus latency: Current and future perspectives*. Current Opinion in Virology 2015; 14: 138-144
58. Kent JR, Kang W, Miller CG, Fraser NW. *Herpes simplex virus latency-associated transcript gene function*. Journal of NeuroVirology 2003; 9: 285-290.
59. Kincaid RP & Sullivan CS. *Virus-Encoded microRNAs: An Overview and a Look to the Future*. PLoS Pathogens 2012; 8: e1003018. doi:10.1371/journal.ppat.1003018
60. King AMQ, Lefkowitz E, Adams MJ, Carstens A, Carstens EB, editores. *Virus Taxonomy. Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. USA: Ed. Elsevier Academic Press, 2012.
61. Knipe DM, Cliffe A. *Chromatin control of herpes simplex virus lytic and latent infection*. Nature Reviews Microbiology 2008; 6: 211-221.
62. Kozomara A & Griffith-Jones S. *miRBase: annotating high confidence microRNAs using Deep sequencing data*. Nucleic Acid Research 2014; 42: D68-D73. doi: <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1181>
63. Krause PR, Ostrove JM.; Straus SE. *The Nucleotide Sequence, 5' End, Promoter Domain, and Kinetics of Expression of the Gene Encoding the Herpes Simplex Virus Type 2 Latency-Associated Transcript*. Journal of Virology 1991; 65: 5619-5623.
64. Kutish G, Mainprize T, Rock D. *Characterization of the Latency-Related Transcriptionally Active Region of the Bovine Herpesvirus 1 Genome*. Journal of Virology 1990; 64: 5730-5737.
65. Liu F, Zheng H, Tong W, Xin-Li G, Tian Q, Liang C, Wei Li L, Zheng XC, Tong GZ. *Identification and Analysis of Novel Viral and Host Dysregulated microRNAs in Variant Pseudorabies Virus-Infected PK15 Cells*. PLoS ONE 2016; 11: e0151546. doi:10.1371/journal.pone.0151546.
66. Luscombe NM, Greenbaum D, Gerstein M. *What is bioinformatics? An introduction and overview*. Yearbook of Medical Informatics 2001. Disponible en web: https://www.ebi.ac.uk/luscombe/docs/imia_review.pdf Consultado el 17 de octubre de 2017.
67. Lycke E, Johansson M, Svennerholm B, Lindahl U. *Binding of herpes simplex virus to celular heparan sulphate, an initial step in the adsorption process*. Journal of General Virology 1991; 72: 1131-1137.
68. MacLachlan NJ, Dubovi EJ, editores. *Fenner's Veterinary Virology*. 4° Ed. USA: Ed, Academic Press, 2011.
69. Manning A, Buchan A, Skinner GRB, Durham J, Thompson H. *The Immunological Relationship between Canine Herpesvirus and Four Other Herpesvirus*. Journal of General Virology 1988; 69: 1601-1608.
70. Margolis TP, Imai Y, Yang L, Vallas V, Krause PR. *Herpes Simplex Virus Type 2 (HSV-2) Establishes Latent Infection in a different population of Ganglionic Neurons tan HSV-1: Role of Latency-Associated Transcripts*. Journal of Virology 2007; 81: 1872-1878.

71. Maul G, Ishov AM, Everett RD. *Nuclear Domain 10 as Preexisting Potential Replication Start Sites of Herpes Simplex Virus Type-1*. *Virology* 1996; 217: 67-75.
72. McGeoch DJ, Rixon FJ, Davison AJ. *Topics in herpesvirus genomics and evolution*. *Virus Research* 2006; 117: 90-104.
73. Mettenleiter TC, Klupp BG, Granzow H. *Herpesvirus assembly: a tale of two membranes*. *Current Opinion in Microbiology* 2006; 9: 423-429.
74. Miyoshi M, Takiguchi M, Yasuda J, Hashimoto A, Takada A, Okazaki K, Kida H. *Structure of the immediate early gene of canine herpesvirus*. *Archives of Virology* 1999^a; 144: 407-420.
75. Miyoshi M, Takiguchi M, Yasuda J, Hashimoto A, Takada A, Okazaki K, Kida H. *Structure of the infected cell protein 0 gene of canine herpesvirus*. *Archives of Virology* 2000; 145: 1715-1723.
76. Miyoshi M, Takiguchi M, Yasuda J, Hashimoto A, Takada A, Okazaki K, Kida H. *Detection of Canine Herpesvirus DNA in the Ganglionic Neurons and the Lymph Node Lymphocytes of Latently Infected Dogs*. *Journal of Veterinary Medical Science* 1999; 61: 375-379.
77. Mori I, Nishiyama Y. *Herpes simplex virus and varicella-zoster virus: why do these human alphaherpesvirus behave so differently from one another?* *Reviews in Medical Virology* 2005; 15: 393-406.
78. Mott KR, Osorio NO, Jin L, Brick DJ, Naito J, Cooper J, Henderson G, Inman M, Jones C, Wechsler S, Perng G-C. *The bovine herpesvirus-1 LR ORF2 is critical for this gene's ability to restore the high wild-type reactivation phenotype to a herpes simplex virus-1 LAT null mutant*. *Journal of General Virology* 2003; 84: 2975-2985.
79. Nakamachi K, Ohara K, Matsumoto Y, Otsuka H. *Attachment and Penetration of Canine Herpesvirus 1 in Non-Permissive Cells*. *Journal of Veterinary Medicine Science* 2000; 62: 965-970.
80. Nicoll MP, Proença JT, Efsthathiou S. *The Molecular basis of herpes simplex virus Latency*. *FEMS Microbiology Reviews* 2012; 36: 684-705.
81. Norkin LC. *Virology. Molecular Biology and Pathogenesis*. USA: Ed, ASM Press, 2010.
82. Ohmura Y, Ono E, Matsuura T, Kida H, Shimizu Y. *Detection of feline herpesvirus 1 transcripts in trigeminal ganglia of latently infected cats*. *Archives of Virology* 1993; 129: 341-347.
83. Ojala PM, Sodeik B, Ebersold MW, Kutay U, Helenius A. *Herpes Simplex Virus Type 1 Entry into Host Cells: Reconstitution of Capsid Binding and Uncoating at the Nuclear Pore Complex In Vitro*. *Molecular and Cellular Biology* 2000; 20: 4922-4931.
84. Papageorgiou KV, Suárez NM, Wilkie GS, McDonald M, Graham EM, Davison AJ. *Genome Sequence of Canine Herpesvirus*. *PLoS ONE* 2016; 11: e0156015.doi:10.1371/journal.pone.0156015

85. Pellet PE, Roizman B. *Herpesviridae*. En: Knipe DM, Howley PM, editores. *Fields Virology*. 6° Ed. China: Ed, Wolters Kluwer-Lippincott Williams & Wilkins, 2013.
86. Perng GC, Maguen B, Jin L, Mott KR, Osorio N, Slanina SM, Yukht A, Ghiasi H, Nesburn AB, Inman M, Henderson G, Jones C, Wechsler SL. *A Gene Capable of Blocking Apoptosis Can Substitute for the Herpes Simplex Virus Type 1 Latency-Associated Transcript Gene and Restore Wild-Type Reactivation Levels*. *Journal of Virology* 2002; 76: 1224-1235
87. Pfeffer S, Sewer A, Lagos-Quintana M, Sheridan R, Sander C, Grässer FA, Van Dyk LF, Ho K; Shuman S, Chien M, Russo JJ, Ju J, Randall G, Lindenbach BD, Rice CM.; Simon V, Ho D, Zavolan M; Tuschl T. *Identification of microRNAs of the herpesvirus family*. *Nature Methods* 2005; 2: 269-276.
88. Porterfield JS. *Andrewes' Viruses of Vertebrates*. 5° Edition. UK: Ed, Bailliére Tindall, 1989.
89. Quinn PJ, Markey BK, Leonard FC, FitzPatrick ES, Fanning S, Hartigan PJ. *Veterinary Microbiology and Microbial Disease*. 2° Ed. Singapore: Ed, Wiley-Blackwell, 2011.
90. Reubel GH, Pekin J, Webb-Wagg K, Hardy CM. *Nucleotide Sequence of Glycoproteins Genes B, C, D, G, H and I, the Thymidine Kinase and Protein Kinase Genes and Gene Homologue UL24 of an Australian Isolate of Canine Herpesvirus*. *Virus Genes* 2002; 25: 195-200.
91. Rock DL. *The molecular basis of latent infections by alphaherpesviruses*. *Seminars in Virology* 1993; 4: 157-165.
92. Roizman B, Knipe DM, Whitley RJ. *Herpes Simplex Viruses*. En: Knipe DM, Howley PM, editores. *Fields Virology*. 6° Ed. USA: Ed, Wolters Kluwer-Lippincott Williams & Wilkins, 2013.
93. Rota PA, Mes RK. *Homology between Feline herpesvirus-1 and Canine herpesvirus*. *Archives of Virology* 1990; 115: 139-145.
94. Ruiz J, Jaime J, Vera V. *Latencia del Herpesvirus Bovino-1: El papel de los Transcritos relacionados con la Latencia (RL)*. *Acta Biológica Colombiana* 2008; 13: 3-12.
95. Sánchez POA. *Bioinformática: Un Enfoque Teórico y Práctico* (Tesis de Licenciatura). México: UNAM, 2010.
96. Shieh MT, WuDunn D, Montgomery RI, Esko JD, Spear PG. *Cell Surface Receptors for Herpes Simplex Virus Are Heparan Sulfate Proteoglycans*. *The Journal of Cell Biology* 1992; 116: 1273-1281.
97. Silvestro C & Bratanich A. *The latency related gene of bovine herpesvirus types 1 and 5 and its modulation of celular processes*. *Archives of Virology* 2016; 161: 3299-3308.
98. Smiley JR. *Herpes Simplex Virus Virion Host Shutoff Protein: Immune Evasion Mediated by a Viral RNase?* *Journal of Virology* 2004; 78: 1063-1068.
99. Sorel O, Dewals BG. *MicroRNAs in large herpesvirus DNA genomes: recent advances*. *Biomolecular Concepts* 2016; 7: 229-239.

100. Spear PG, Eisenberg RJ, Cohent GH. *Three Classes of Cell Surface Receptors for Alphaherpesvirus entry*. Virology 2000; 275: 1-8.
101. Spillmann D. *Heparan Sulfate: Anchor for viral intruders?* Biochimistry 2001; 83: 811-817.
102. Steven AC, Roberts CR, Hay J, Bisher ME, Pun T, Trus BL. *Hexavalent capsomers of Herpes Simplex Virus Type 2: Symmetry, Shape, Dimensions, and Oligomeric Status*. Journal of Virology 1986; 57: 578-584.
103. Sullivan CS & Ganem D. *MicroRNAs and Viral Infection*. Molecular Cell 2005; 20: 3-7.
104. Tang Q, Wu YQ, Chen DS, Zhou Q, Chen HC Liu ZF. *Bovine hepesvirus 5 encodes a unique pattern of microRNAs compared with bovine herpesvirus 1*. Journal of General Virology 2013; 95: 671-678.
105. Tav C, Tempel S, Poligny L, Tahiri F. *miRNAfold: a web server for fast miRNA precursor prediction in genomes*. Nucleic Acid Research 2016; 44 (W1): W181-W184. doi: <https://doi.org/10.1093/nar/gkw459>
106. Thomas SK, Gough G, Latchman DS, Coffin RS. *Herpes Simplex Virus Latency-Associated Transcript Encodes a Protein Which Greatly Enhances Virus Growth, Can Compensate for Deficiencies in Immediate-Early Gene Expression, and Is Likely To Function during Reactivation from Virus Latency*. Journal of Virology 1999; 73: 6618-6625.
107. Thomas SK, Lilley CE, Latchman DS, Coffin RS. *A protein Encoded by the Herpes Simplex Virus (HSV) Type 1 2-Kilobase Latency-Associated Transcript is Phosphorylated, Localized to the Nucleus, and Overcomes the Repression of Expression from Exogenous Promoters When Inserted into the Quiescent HSV Genome*. Journal of Virology 2002; 76: 4056-4067.
108. Townsend WM, Stiles J, Gupitill-Yoran L, Krohne SG. *Development of a reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay to detect feline herpesvirus-1 latency-associated Transcripts in the trigeminal ganglia and corneas of cats that did not have clinical signs of ocular disease*. American Journal of Veterinary Research 2004; 65: 314-319
109. Tran VDT, Tempel S, Zerath B, Zehraoui F, Tahiri F. *miRBoost: boosting support vector machines for microRNA precursor classification*. RNA 2015; 21: 775-785. doi: 10.1261/rna.043612.113
110. Trybala E, Bergström T, Spillman D, Svennerholm B, Flynn SJ, Ryan P. *Interaction between Pseudorabies Virus and Heparin/Heparan Sulfate*. The Journal of Biological Chemistry 1998; 273: 5047-5052.
111. Umbach JL, Kramer MF, Jurak I, Karnowski HW, Coen DM, Cullen BR. *MicroRNAs expressed by herpes simplex virus 1 during latent infection regulate viral mRNAs*. Nature 2008; 454: 780-785.
112. Valdivia LEG. *Aislamiento, identificación y primer estudio de Seroprevalencia de Herpesvirus Canino (CHV-1) en México* (tesis de Maestría). México: UNAM, 2015.

113. Valyi-Nagy T, Shukla D, Engelhard HH, Kavouras J, Scanlan P. *Chapter 1. Latency Strategies of Alphaherpesviruses: Herpes Simplex Virus and Varicella-Zoster Virus Latency in Neurons*. En: Minarovits J, Gonczol E, Valyi-Nagy T, editores. *Latency Strategies of Herpesviruses*. USA: Ed, Springer, 2007.
114. Wang QY, Zhou C, Johnson KE, Colgrove RC, Coen DM, Knipe DM. *Herpesviral Latency-associated transcript gene promotes assembly of heterochromatin on viral lytic-gene promoters in latent infection*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 2005; 102: 16055-16059.
115. Wechsler SL, Nesburn AB, Zwaagstra J, Ghiasi H. *Sequence of the Latency-Related Gene of Herpes Simplex Virus Type 1*. Virology 1989; 168: 168-172.
116. Wheeler DL, Church DM, Federhen S, Lash AE, Madden TL, Pontius JU, Schuler GD, Schriml LM, Sequeira E, Tatusova TA, Wagner L. *Database resources of the National Center for Biotechnology*. Nucleic Acids Research 2003; 31: 28-33.
117. Whitley RJ. (1996). *Chapter 68: Herpesviruses*. En: Baron S, editor. *Medical Microbiology*. 4° Ed. USA: Ed, Universtiy of Texas Medical Branch, 2012. Disponible en web: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK8157/> Revisado el 17 de octubre de 2017.
118. Wilson AC, Mohr I. *A cultured affair: HSV Latency and reactivation in neurons*. Trends in Microbiology 2012; 20: 604-611.
119. Wu YQ, Chen DJ, He HB, Chen DS, Chen LL, Chen HC, Liu ZF (2012). *Pseudorabies Virus Infected Porcine Epithelial Cell Line Generates a Diverse Set of Host MicroRNAs and a Special Cluster of Viral MicroRNAs*. PLoS ONE 2012; 7: e30988. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030988>.
120. Wudunn D, Spear PG. *Initial interaction of Herpes Simplex Virus with Cells Is Binding to Heparan Sulfate*. Journal of Virology 1989; 63: 52-58.
121. Wysocka J, Herr W. *The herpes simplex virus VP16-induced complex: the makings of a regulatory switch*. Trends in Biochemical Sciences 2003; 28: 294-304.
122. Xiang J, Cheng A, Wang M, Zhang S, Zhu D, Jia R, Chen S, Zhou Y, Wang X, Chen X. *Computational identification of microRNAs in Anatid herpesvirus 1 genome*. Virology Journal 2012; 9: 93.
123. Zhou ZH, Chen DH, Jakana J, Rixon FJ, Chui W. *Visualization of Tegument-Capsid Interactions and DNA in Intact Herpes Simplex Virus Type 1 Virions*. Journal of Virology 1999; 73: 3210-3218.
124. Zhou ZH, Doughert M, Jakana J, He J, Rixon FJ, Chiu W. *Seeing the Herpesvirus Capsid at 8.5 Å*. Science 2000; 288: 877-880

125. Zhou ZH, Lo P. *Chapter 18. Structure and Assembly of Human Herpesviruses: New Insights from Cryo-Electron Microscopy and Tomography*. En: Cheng RH, Miyamura T, editores. *Structure-based Study of Viral Replication*. Singapore: Ed. World Scientific, 2008.

