



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD XOCHIMILCO
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO PRODUCCIÓN AGRÍCOLA Y ANIMAL
LICENCIATURA EN MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

PROYECTO DE SERVICIO SOCIAL

**“Desarrollo de una vacuna ADN para el control de la parvovirus
canina”**

Presentador del Servicio Social:

Maricarmen Tejada Dubois

Matrícula: 2133026429

Asesores:

Estela Teresita Méndez Olvera

No. Econom. 29747

Daniel Martínez Gómez

No. Econom. 30356

Lugar de realización: Laboratorio de Microbiología Agropecuaria, de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco

Fecha de inicio y término: 06/01/2020 a 07/07/2020.

Tabla de contenido

<i>Parvovirus Canino y vacunas de ADN</i>	2
Parvovirus canino definición	2
Vacunación contra parvovirus canino	3
Vacunas de ADN contra Parvovirus canino tipo 2b	6
Resultados y discusión	9
<i>Trabajos citados</i>	20

Parvovirus Canino y vacunas de ADN

Parvovirus canino definición

La parvovirus es una enfermedad de distribución mundial y es una de las causas más importante de mortalidad en cachorros de dos o más meses de edad. Las primeras evidencias sobre su existencia datan de 1977, aunque el verdadero interés por la enfermedad surgió en 1978 con la aparición del parvovirus canino tipo 2 (PVC - 2). Este nuevo agente había sido aislado en los Estados Unidos de muestras de casos de gastroenteritis epizootica en caninos domésticos, y se denominó PVC-2 para distinguirlo del PVC-1 o MVC (*Canine minute virus*), descrito anteriormente. La parvovirus está caracterizada por depresión, pérdida de apetito, vómito, diarrea hemorrágica severa y leucopenia (Miranda & Thompson, 2016; Zhou, et al., 2017; Vasu, et al., 2019; Kelman, et al., 2019).

El PVC-2 pertenece a la familia Parvovirinae, subfamilia *Parvoviridae*, que comprende tres géneros: *Erythrovirus* el cual incluye el *virus B19* que afecta a los humanos; *Protoparvovirus* que afecta a un gran número de vertebrados, y al que pertenece el PVC; *Dependovirus*, que requiere de la presencia de un virus cooperador para poder replicarse, como por ejemplo el *Adenovirus* (Miranda & Thompson, 2016; Zhou, et al., 2017; Kelman, et al., 2019).

Los integrantes del género *Protoparvovirus* se caracterizan por tener un diámetro aproximadamente de 18 a 26 nanómetros (25nm en el caso de PVC - 2), carecen de envoltura, y poseen cadena sencilla de ADN; su cápside tiene una simetría icosaédrica, y pesa aproximadamente 5.8×10^6 Da. Posee 60 subunidades protéicas, de las cuales el 90% son la proteína VP2 (67 KDa) y 10% VP1 (83 KDa) y VP3 (67 KDa). Su genoma consta de aproximadamente 5000 pares de bases en una sola cadena lineal, con palíndromos terminales. Es uno de los virus más resistentes que se conocen; termoestable ya que soporta hasta 60°C por 60 minutos, resistente al éter, cloroformo y a un rango de pH de 3 a 9. En contraste, es sensible al hipoclorito de sodio en exposición prolongada a una proporción de 1:30 y también puede ser inactivado con luz solar y formalina.

La transmisión directa ocurre vía fecal-oral, teniendo un periodo de incubación de tres a cinco días; la entrada a la célula huésped comienza por su unión a los

receptores de la transferrina, seguido por la endocitosis y su transporte posterior a través del citoplasma hasta el núcleo.

Tras el primer contacto, se replica en el tejido linfóide de la orofaringe, posteriormente llega a nódulos linfáticos mesentéricos y timo; una vez en estado de viremia llega a criptas intestinales. Después de uno a cinco días tras la infección, el virus se disemina a los epitelios oral, esofágico e intestinal, tejido miocárdico y médula ósea. Al replicarse en el epitelio germinal de las criptas intestinales que están en constante división celular, provoca su necrosis, con la consecuente atrofia de vellosidades; manifestándose signos clínicos de enteritis como vómito, diarrea profusa, anorexia, y fiebre recurrente de hasta 41°C. En consecuencia, las heces acarrean partículas virales infecciosas entre el tercer y cuarto día pos-infección; antes de que se presenten los signos clínicos; aproximadamente 1×10^{12} partículas por gramo de heces, en un lapso de siete a 14 días (Miranda & Thompson, 2016).

Además de los signos gastroentéricos; al provocar una leucopenia grave, otros patógenos oportunistas presentes en la microbiota normal son capaces de complicar la enfermedad con daño intestinal severo, consecuente bacteremia, endotoxemia y coagulación intravascular diseminada (Miranda & Thompson, 2016; Vasu, et al., 2019; Kelman, et al., 2019).

Vacunación contra parvovirus canino

La enfermedad provocada por el PVC usualmente es controlada mediante la utilización de vacunas vivas o inactivas conformadas por viriones completos de PVC, sin embargo, los anticuerpos derivados maternos (MDAs) representan el mayor de los desafíos para la inmunización de los jóvenes individuos, pues inhiben la replicación de la vacuna en aquellos cachorros poseedores de inmunidad temporal evitando una inmunización eficaz (Jiang et al 1998; Gupta et al 2005). Sólo algunas vacunas de virus vivo modificado que se han especificado en estudios previos son capaces de conferir inmunidad ante la presencia de MDAs; sin embargo, su mayor desventaja es que las partículas virales son excretadas tras la vacunación. Por esta razón las vacunas de virus inactivado con adyuvante son consideradas más seguras, pues no existe excreción de las partículas virales; pero su desventaja

radica en las altísimas concentraciones de antígeno que son requeridas para estimular una respuesta humoral, particularmente en los individuos que aún presentan MDAs. Se ha observado que la inmunidad pasiva a ciertos antígenos dura periodos de hasta cuatro meses, donde los niveles MDA aún son suficiente para interferir la inmunización del individuo. Conforme la concentración de estos MDAs va declinando, el cachorro puede estar susceptible a la infección, pero manteniéndose refractario a la vacunación (Tarpey & Greenwood, 2001; Dahiya, et al., 2011).

El desarrollo de otras vacunas contra PVC incluye la síntesis de una vacuna recombinante que utiliza el sistema de expresión de baculovirus, con la desventaja de proveer un único pulso del antígeno y por lo tanto requiere múltiples dosis para conseguir una protección eficaz. Y una vacuna de péptido sintético, cuya estimulación del hospedero se encuentra proporcionalmente limitada a la cantidad de epítomos antigénicos inoculados (Jiang, et al., 1998; Dahiya, et al., 2011; Dahiya, et al., 2012).

En contraste con las anteriores, las vacunas de ADN tienen la ventaja de eliminar el uso de adyuvantes tóxicos, y permiten la expresión de manera continua del antígeno viral completo en su forma nativa, esto resulta en una mejor respuesta inmune (Jiang, et al., 1998; Dahiya, et al., 2012). Las vacunas de ADN han sido desarrolladas con la ventaja adicional de no proveer riesgo de neutralización por anticuerpos derivados maternos (MDA), por lo tanto, no es necesaria la administración de múltiples dosis para la inmunización del individuo.

Vacunación experimental contra PVC

Desarrollos recientes en el campo de la vacunación han resultado en una nueva clase de vacunas que confieren inmunidad mediante la transfección de las células del hospedero con un plásmido de ADN o moléculas de ARN no replicante, que permiten la expresión de proteínas inmunógenas o epítomos antigénicos. Este enfoque novedoso provee el potencial para revolucionar la vacunación como método para el control de las enfermedades infecciosas en animales y humanos. Las vacunas de ADN son capaces de inducir tanto la inmunidad humoral como la

inmunidad celular, sin muchas de las desventajas asociadas a las vacunas que actualmente se utilizan; entre ellas, no se replican y por lo tanto son incapaces de infectar al hospedero, no requieren el uso de adyuvantes, su manufactura es sencilla, son económicas, han mejorado la inmunidad cruzada, y confieren respuestas inmunitarias de mayor duración aún en presencia de MDAs; volviéndolas útiles para países en vías de desarrollo y convirtiéndolas en una alternativa favorable para las vacunas convencionales y recombinantes (Jiang, et al., 1998; Tarpey & Greenwood, 2001; Gupta, et al., 2005; Patial, et al., 2007; Dahiya, et al., 2012).

Después de conceptualizar la inmunización con ADN en los 90's, ha ocurrido un rápido desarrollo de su metodología; incluyendo aplicaciones experimentales en contra de un gran número de agentes virales, bacterianos, e incluso parasitarios, utilizando no únicamente la vía intramuscular, si no también intradérmica, por mucosas, inoculación por biojector o por entrega directa en la piel (Patial, et al., 2007; Dahiya, et al., 2012).

En la práctica en caninos, el uso de vacunas multivalentes para la inmunización en contra de distintos agentes virales y bacterianos es común. La inmunización de ADN en contra de todos estos agentes requeriría una gran cantidad de plásmidos de ADN e inyecciones múltiples para la inducción de la inmunidad protectora. Con el desarrollo de un vector de expresión bicistronica de mamífero, explotando las secuencias del sitio de entrada ribosómico interno (IRES) del Citomegalovirus (CMV), virus de la polio, y virus de la encefalomiocarditis; es posible expresar dos proteínas de un solo mRNA. En el mRNA bicistronico, el primer ORF presente antes del IRES es traducido por un dependiente de cap, mientras que el ORF presente en contra sentido del IRES, es traducido de manera cap-independiente.

Esta estrategia ha sido utilizada en el desarrollo de plasmidos de ADN bicistronicos para la expresión de dos proteínas con su subsecuente intensificación de las respuestas inmunitarias (Patial, et al., 2007).

A pesar de que la inmunización con ADN induce fuertes respuestas inmunitarias en los ratones, ha habido menos éxito en la vacunación de animales de gran tamaño,

principalmente debido a las cantidades de ADN que son requeridas para inducir suficiente inmunidad y la inapropiada entrega del plásmido de ADN a las células del sistema inmune. Para superar estas limitaciones, el sistema de expresión autoamplificador y autolimitante basado en replicón de *Alfavirus* ha sido desarrollado y utilizado para mejorar e incrementar la expresión del antígeno en la vacunación con ADN. Para la entrega del plásmido de ADN directamente en el citoplasma de las células presentadoras de antígeno, una variedad de bacterias tanto Gram positivas, como Gram negativas, incluyendo *Salmonella*, *Shigella* y *Escherichia coli* han sido utilizadas exitosamente como transporte para la correcta entrega de las construcciones de ADN o los antígenos vacunales, y para modelos animales para vacunación en contra de una gran cantidad de enfermedades infecciosas tanto de origen bacteriano como viral, incluyendo VIH, virus de la hepatitis B, virus de la enfermedad de Newcastle, y virus de la enfermedad de la bursa. Las bacterias enteropatógenas que se han utilizado como transportadoras de vacunas ADN han sido tanto patógenos extracelulares como *E. coli* y *Yersinia* spp., como patógenos intracitosólicos como *Listeria monocytogenes* y *Shigella* spp (Dahya et al., 2011).

Así mismo se han desarrollado vectores de expresión basados en “replicones de ADN”, desarrollados de familias virales, la mayoría de virus ARN de cadena positiva, principalmente *Togaviridae*, *Flaviviridae* y *Picornaviridae* (resaltan los generos de las familias específicas de los virus). Se ha demostrado que las vacunas de ADN basadas en “replicones de ADN” proveen niveles más altos de inmunidad protectora y rompimiento de la tolerancia inmunológica, mediante la activación de las vías antivirales innatas mediadas por dsARN (Dahiya, et al., 2012).

Vacunas de ADN contra Parvovirus canino tipo 2b

La primera vacuna, desarrollada en el año 1998 fue construida a partir de un producto de PCR del ADN de una cepa de campo de PVC-2b y el vector pGT36. El análisis de la secuencia del pGT36VP1 mostró una diferencia de sólo un aminoácido, básicamente un cambio en la posición 464 de alanina por serina, lo cual no afectó la respuesta inmunitaria inducida. Todos los individuos inmunizados presentaron

títulos de anticuerpos de 1:40 o mayores, y en la prueba de desafío mostraron estar protegidos contra la enfermedad (Jiang, et al., 1998).

En el 2001, otra vacuna ADN fue desarrollada, solo que en esta se utilizó la proteína VP2 del PVC-2a, la cual fue clonada en el vector pl.18. Esta vacuna fue evaluada en cachorros de 8 – 9 semanas de edad, los cuales fueron desafiados con una cepa de campo de PVC-2b. Los resultados obtenidos mostraron que los cachorros inmunizados resultaron positivos en la prueba de hemaglutinación, con valores por encima del título de anticuerpos mínimo protector (1:80), según la OMS y USCDC (*WHO's Expert Rabies Committee y United States Centres for Disease Control & Prevention*). De la misma forma, se evaluó la inmunogenicidad y eficacia de la vacuna VP2-pl.18 en 10 cachorros beagle de 5 a 6 semanas, los cuales poseían MDAs. Los resultados obtenidos mostraron que los individuos con títulos de 1:32 a 1:128 de MDA, desarrollaron un declive en la producción de anticuerpos en el día 7 postinmunización. Sin embargo, esta reducción sólo fue temporal y los individuos desarrollaron posteriormente anticuerpos a los 14 días, alcanzando títulos de hasta 1:1024 (Tarpey & Greenwood, 2001).

En el año 2005, otra vacuna ADN fue construida empleando la secuencia de la proteína VP2 de la cepa CPV-N (**M19296, GenBank**), clonada en el vector pTarget. El análisis de esta vacuna mostró que los individuos inmunizados con o sin adyuvante fueron exitosamente protegidos contra la enfermedad, y no arrojaron partículas virales por heces (Gupta, et al., 2005). Los resultados concuerdan con Jiang y colaboradores (1998), quienes también demostraron la inmunogenicidad del ADN desnudo.

Más adelante, en el 2007, una vacuna de ADN bicistrónico, construida en el vector pIRES, fue desarrollada mediante la subclonación de los genes VP2 y Rab-G (una glicoproteína del virus rábico) dando origen a la vacuna pG-IRES-VP2. LA evaluación de la inmunogenicidad de esta vacuna mostró la presencia de anticuerpos contra rabia y PVC mediante ELISA y virus suero neutralización (VN); confirmando la efectividad del plásmido bicistrónico como vacuna para la prevención de ambas enfermedades. En el caso de rabia, la evaluación de la

protección en modelo murino mostró un porcentaje de supervivencia del 85% (Patial, et al., 2007).

Dahiya y colaboradores (2011) evaluaron la eficacia de la vacunación oral en perros con células DH5 α como sistema de entrega de una vacuna de ADN basada en el replicón del virus Sindbis pAlpha-PVC-VP2, el cual contenía el gen de la proteína VP2 completo. Los resultados evidenciaron un incremento significativo en la producción de IgG mediante ELISA y una eficacia protectora mayor a 1:32 mediante virus suero neutralización, en el día 21 post-inmunización. La evaluación de subpoblaciones de linfocitos mostró un incremento de más del doble en las subpoblaciones de linfocitos CD4+ y CD8+.

En estudios previos se ha reportado que la vacuna basada en “replicones de ADN” en contra de otras enfermedades induce una respuesta de inmunidad mediada por células (CMI) mediante la inducción de apoptosis, y la generación de intermediarios de dsARN durante la replicación del *Alfavirus*, mismos que sirven como adyuvantes para la inmunización. En el caso de la vacuna contra PVC esta actividad permitió la producción de niveles suficientes de anticuerpos y respuesta celular específica (Dahiya, et al., 2011).

En el año 2012, se comparó la eficacia de las vacunas: Sindbis pAlpha-PVC-VP2, pTargeT-PVC-VP2 y una vacuna inactiva comercial, las cuales fueron administradas por vía intradérmica en el pabellón auricular. Los resultados obtenidos mostraron la inducción de anticuerpos en todos los individuos vacunados, mediante VN y ELISA, sin embargo, los títulos en VN fueron significativamente más altos en los perros inmunizados con la vacuna Sindbis pAlpha-PVC-VP2, en comparación con la vacuna de ADN pTargeT-PVC-VP2 y la vacuna comercial. Además, la respuesta linfoproliferativa y la promoción de efectores celulares CD4+/CD8+ fue significativamente más alta con esta vacuna, en comparación con la vacuna pTargeT-PVC-VP2 (Dahiya, et al., 2012).

Los ensayos anteriores muestran la utilidad de las vacunas ADN en la prevención de la parvovirus canina, no obstante, a la fecha no se ha hecho un análisis de

cuales o cual debería de ser el antígeno colocado en estas vacunas. Como se aprecia en todas ellas se emplean secuencias completas de la proteína VP2, lo que podría limitar su efectividad, En este trabajo se realizó un análisis de secuencias para inferir cuales podrían ser las regiones más inmunogénicas de esta proteína, las cuales podrían colocarse en vacunas ADN.

Resultados y discusión

Tras la declaración de la emergencia sanitaria por Covid-19, las actividades experimentales del proyecto de servicio social se interrumpieron, cuando el 20 marzo del 2020 la UAM cerró las instalaciones. De acuerdo con el cronograma de actividades, para esas fechas sólo se tenía recuperado el vector de clonación pVAX (ver **Anexo, Figura 1**) y se había comenzado con la extracción de ADN de heces para la amplificación de los segmentos requeridos. Ante la imposibilidad de continuar con la fase experimental, el trabajo se continuó *in silico*, diseñando iniciadores para la amplificación de tres segmentos de la proteína VP2. Los criterios para la selección de los segmentos se basaron en la localización de potenciales determinantes antigénicos (por medio de análisis de secuencias y predicción de estructura) útiles para la construcción de una vacuna de ADN que confiera inmunidad contra las cepas de PVC - 2a, 2b y 2c. Cabe mencionar que en esta propuesta, a diferencia de otros trabajos previos donde se han desarrollado vacunas de ADN contra PVC, no se utilizaron los 1755pb correspondientes a la proteína VP2 completa.

Para la construcción de la propuesta se recuperaron de las bases de datos del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), 100 secuencias de la proteína VP2 del PVC. Para la selección de estas 100 secuencias se decidió ocupar como elemento de búsqueda la secuencia *NCBI (Reference Sequence): NC_001539.1*, correspondiente al genoma completo del PVC tipo 2. Básicamente se empleó esta secuencia para incluir en las 100 secuencias, las variantes 2a, 2b y 2c, ya que, de acuerdo con análisis filogenéticos previos, estas tres subvariantes se derivaron de este tipo.

La búsqueda de secuencias homólogas mediante la herramienta *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST), arrojó 100 secuencias con un porcentaje de identidad de 98 al 100%. Una inspección detallada de las secuencias seleccionadas mostró la existencia de las tres subvariantes en las secuencias seleccionadas. En el caso de la variante 2a, quedo representada por las secuencias MK144546.1, FJ005258.1 y MW653256.1, para 2b por las secuencias LC270891.1, DQ025950.1, KX425921.1, FJ005263.1 y MF177280.1, y para 2c, FJ222821.1 y MW653253.1 (**Figura 1**). Como se puede apreciar en la **Figura 1**, la distribución de estas variantes dentro del árbol filogenético se corresponde con una sola rama y no existe una diferenciación entre ellas.

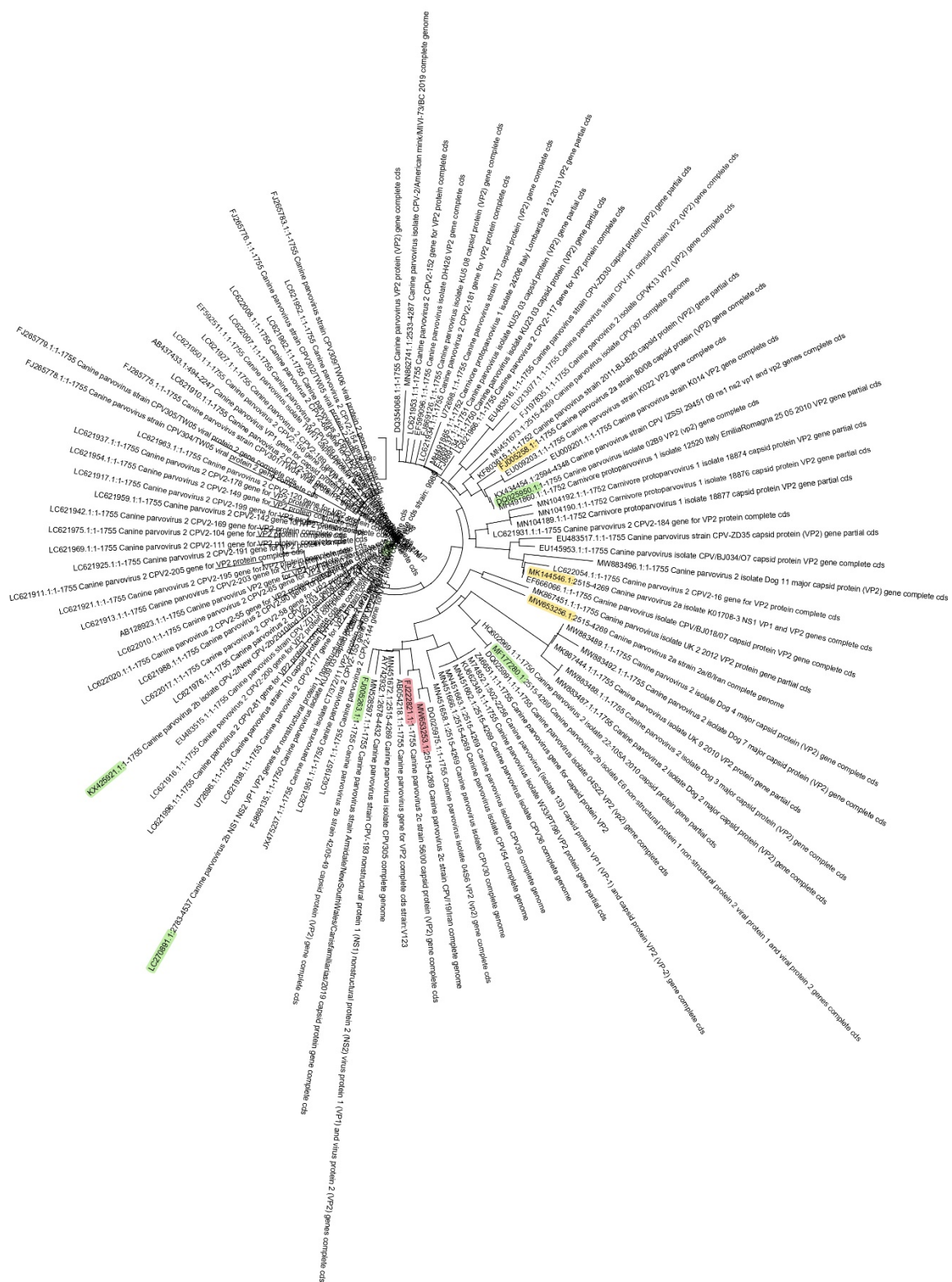


Figura 1. Relaciones evolutivas de las secuencias de la proteína VP2. La historia evolutiva se dedujo mediante el método Neighbor-Joining (Saitou & Nei, 1987). Se muestra el árbol óptimo con la suma de longitudes de rama = 0,07129739. Las distancias evolutivas se calcularon mediante el método de Máxima Verosimilitud Compuesta (Tamura, et al., 2004) y están

en las unidades del número de sustituciones de bases por sitio. Este análisis incluyó 100 secuencias de nucleótidos. Las posiciones de codones incluidas fueron 1^a+2^a+3^a+no codificante. Se eliminaron todas las posiciones ambiguas de cada par de secuencias (opción de eliminación por pares). El conjunto de datos final contenía un total de 1.755 posiciones. Los análisis evolutivos se realizaron en MEGA X (Kumar, et al., 2018). En color amarillo se muestran las secuencias correspondientes a la variante 2a, en verde las correspondientes a la variante 2b y en rojo las correspondientes a 2c.

Como se ha mencionado previamente, la capsida viral del PVC esta conformada en un 90% por la proteína VP2, y el 10% restante corresponde a las proteínas VP1 y VP3, de las cuales, VP3 a su vez corresponde a un fragmento de la proteína VP2; por esta razón, la inoculación de individuos con segmentos altamente conservados podría generar inmunidad hacia las tres variantes. Por otra parte, el segmento de ADN correspondiente a la proteína VP2 completa es muy extenso, por lo que su clonación y expresión es más complicada, y finalmente, la expresión de la proteína VP2 en trans, podría derivar en la síntesis de cápsides virales; por estos motivos en este trabajo se seleccionaron sólo tres segmentos con un tamaño de 70 a 80 residuos, lo que facilita su expresión y clonación.

La obtención de los tres fragmentos proteicos, los cuales potencialmente fungirán como determinantes antigénicos para la inmunoestimulación de individuos contra las cepas de PVC tipo 2a, 2b y 2c, se realizó de la siguiente forma. Las 100 secuencias seleccionadas de la proteína VP2 fueron comparadas en el software DNAMAN, con el fin de ubicar las regiones idénticas dentro de las mismas. El análisis hecho con este software mostró una similitud del 99.79% entre las 100 secuencias, con segmentos con identidad de 100%. De estos segmentos altamente conservados se seleccionaron aquellos con una longitud de al menos 150 nucleótidos, con la finalidad obtener un segmento que codificara para un péptido de al menos 50 residuos de aminoácidos. Estos péptidos, tienen la longitud suficiente para que las proteínas del complejo principal de histocompatibilidad clase I y II permitan su presentación a células del sistema inmunitario.

Los segmentos seleccionados son:

1. Segmento 1; de la posición 63 - 276; en total 213 pb (**Figura 2, a**):

GGATCTGGGAACGGGTCTGGAGGCGGGGGTGGTGGTGGTTCTGGGG
GTGTGGGGATTTCTACGGGTACTTTCAATAATCAGACGGAATTTAAATTTTTGG
AAAACGGATGGGTGGAAATCACAGCAAACCTCAAGCAGACTTGTACATTTAAAT
ATGCCAGAAAGTGAAAATTATAGAAGAGTGGTTGTAAATAATTTGGATAAACT
GCAGTTA

Que codifican para 71 aminoácidos:

GSGNGSGGGGGGGSGGVGITGTFNNQTEFKFLENGWVEITANSSRLVHL
NMPESENYRRVVVNNLDKTAV

2. Segmento 2; de la posición 467 a 677, con una longitud total de 210 pb
(**Figura 2, b**):

TGCTACTCAGCCACCAACTAAAGTTTATAATAATGATTTAACTGCATCAT
TGATGGTTGCATTAGATAGTAATAACTATGCCATTTACTCCAGCAGCTATGA
GATCTGAGACATTGGGTTTTTATCCATGGAAACCAACCATAACCAACTCCATGG
AGATATTATTTCAATGGGATAGAACATTAATACCATCTCATACTGGAAGTAGT

Que codifican para 70 aminoácidos:

ATQPPTKVYNNDLTASLMVALDSNNTMPFTPAAMRSETLGFYPWKPTIPT
PWRYYFQWDRTLIPSHTGTS

3. Segmento 3; de la posición 1318 a 1558; con una longitud de 240 pb (**Figura 3, c**):

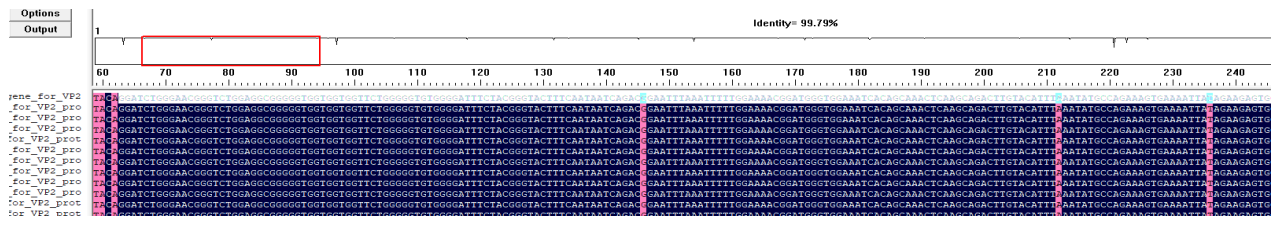
CAGGAATTAACTATACTAATATATTTAATACTTATGGTCCTTTAACTGCA
TTAAATAATGTACCACCAGTTTATCCAAATGGTCAAATTTGGGATAAAGAATTT
GATACTGACTTAAAACCAAGACTTCATGTAAATGCACCATTTGTTTGTCAAAT
AATTGTCCTGGTCAATTATTTGTAAAAGTTGCACCTAATTTAACAAATGAATAT
GATCCTGATGCATCTGCTAATATGTCAAG

Que codifican para 80 aminoácidos:

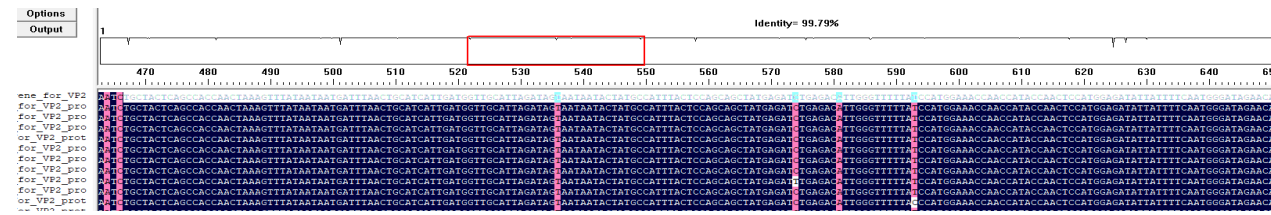
GINYTNIFNTYGPLTALNNVPPVYPNGQIWDKEFDTDLKPRHLHVNAPFVCQN
NCPGQLFVKVAPNLTNEYDPDASANMSE

Las secuencias de aminoácidos seleccionadas fueron ahora analizadas con la herramienta BLAST. Los resultados mostraron que el primer péptido de 71 residuos (**Figura 2, a**) tiene una homología del 98.55 a 98.59% con proteínas VP2 de parvovirus canino de las variantes 2a, 2b y 2c. Este segmento también mostro identidad con proteínas de cápside del virus de la panleucopenia felina (VP1 -

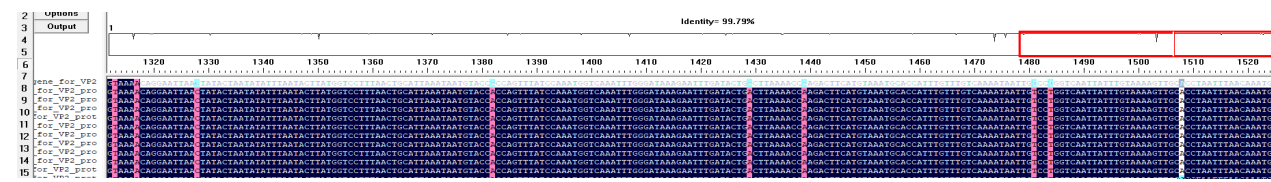
En el caso del segundo péptido (Figura 2, b) el análisis muestra una identidad del 98.57% al 100% con proteínas VP2 de parvovirus canino de las variantes 2a y 2b



a) Segmento 1: de la posición 63 - 276; en total 213 pb, 71 aminoácidos.



b) Segmento 2: de la posición la posición 467 a 677, con una longitud total de 210 pb; 70 aminoácidos.



c) Segmento 3: de la posición 1318 a 1558, con una longitud de 240 pb; 80 aminoácidos.

Figura 2. Alineamiento de las 100 secuencias de la proteína VP2; la barra superior representa como u secuencia de 1755 pb de la proteína VP2, el recuadro rojo señala: a) segmento 1, de posición 63 a 276, b) 467 a 677 y c) segmento 3, de 1318 a 1558.

(carece de identidad con la variante 2c), para este péptido se observó una identidad del 100% con con las proteínas VP2 de los virus de la panleucopenia felina, parvovirus felino, protoparvovirus carnívoro 1 y parvovirus del tejón.

Finalmente, el análisis de la tercera secuencia (**Figura 2, c**) mostró una identidad del 97.5% al 98.75% con proteínas VP2 de parvovirus canino de las variantes 2a, 2b y 2c, además de compartir una identidad de 98.75% con proteínas de la cápside del virus de la panleucopenia felina (VP1) y parvovirus felino (VP).

Éste análisis nos permitió establecer la utilidad de los tres segmentos seleccionados para la vacuna de ADN, ya que los epítomos que se podrían generar de ellos, conferirían inmunidad contra las tres variantes del PVC, con excepción del segundo péptido, mismo que únicamente mostró homología con los tipos 2a y 2b. (Tarpey & Greenwood, 2001; Gupta, et al., 2005; Patial, et al., 2007; Dahiya, et al., 2011; Dahiya, et al., 2012);

Con el fin de establecer las características de los péptidos seleccionados se realizó un perfil de hidrofobicidad de los tres péptidos con el programa DNAMAN. Los resultados obtenidos mostraron para el peptido 1 valores de hidrofobicidad de 3.00 a -2.82 (**Gráfico 1**), para el péptido 2 de 2.92 a -2.95 (**Gráfico 2**) y para el péptido 3 de 2.17 a -2.95 (**Gráfico 3**). El análisis de la distribución de los residuos mostró que para el péptido 3 la cantidad de residuos hidrófilos era menor que los otros 2; estos datos sugieren que los tres segmentos forman estructuras secundarias diversas. Por otra parte, el análisis composición de los tres segmentos mostró una alta diversidad de residuos y puntos isoeléctricos entre los tres pépticos (**Tabla 1**).

Aminoácido	Péptido 1	Péptido 2	Péptido 3
Ala (A)	2	5	5
Cys (C)	0	0	2
Asp (D)	1	3	5
Glu (E)	5	1	3
Phe (F)	3	3	4
Gly (G)	15	2	4
His (H)	1	1	1
Ile (I)	2	2	3
Lys (K)	2	2	3
Leu (L)	4	5	6
Met (M)	1	3	1
Asn (N)	9	4	12
Pro (P)	1	9	9
Gln (Q)	1	2	3
Arg (R)	3	3	1
Ser (S)	6	5	2
Thr (T)	5	11	5
Val (V)	7	2	6
Trp (W)	1	3	1
Tyr (Y)	1	4	4
Punto isoelectrico	pI = 5.72	pI = 8.97	pI = 4.24
Peso molecular	7212.4 Da	7993.6 Da	8926.3 Da

Tabla 1. Composición, punto isoelectrico (pI) y peso molecular de los péptidos 1, 2 y 3

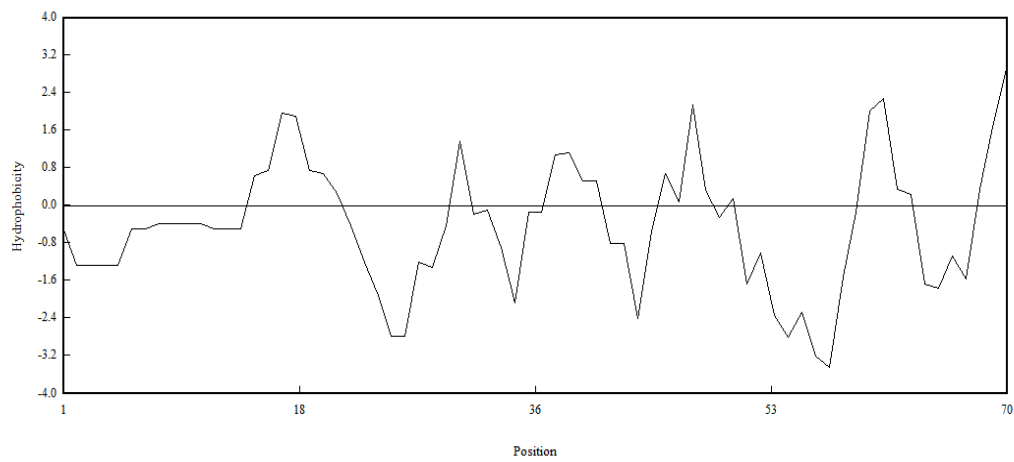


Gráfico 1. Hidrofobicidad correspondiente a los 71 aminoácidos del Péptido 1.

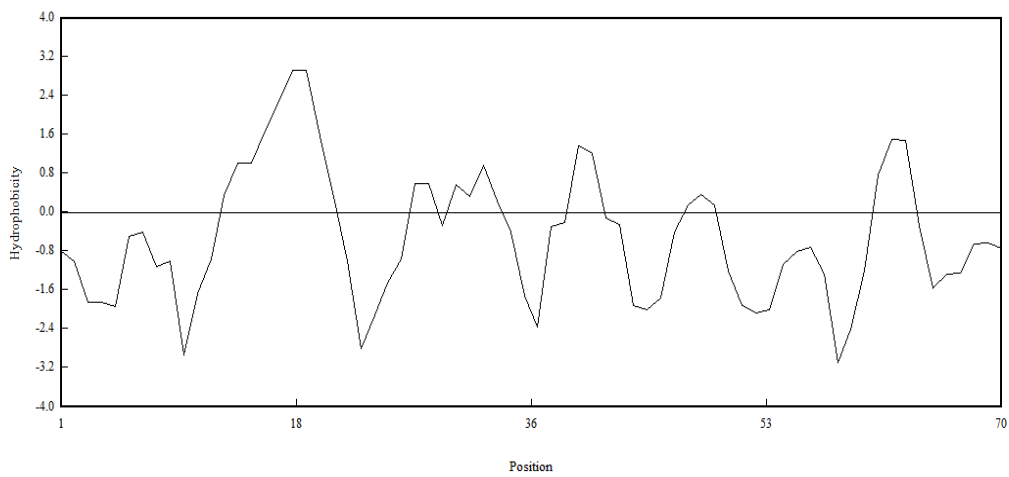


Gráfico 2. Hidrofobicidad correspondiente a los 70 aminoácidos del Péptido 2.

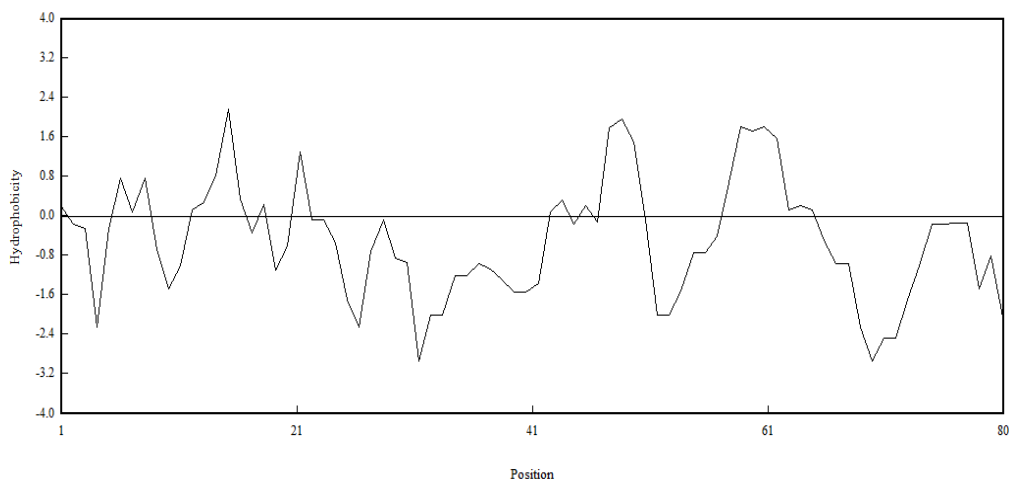


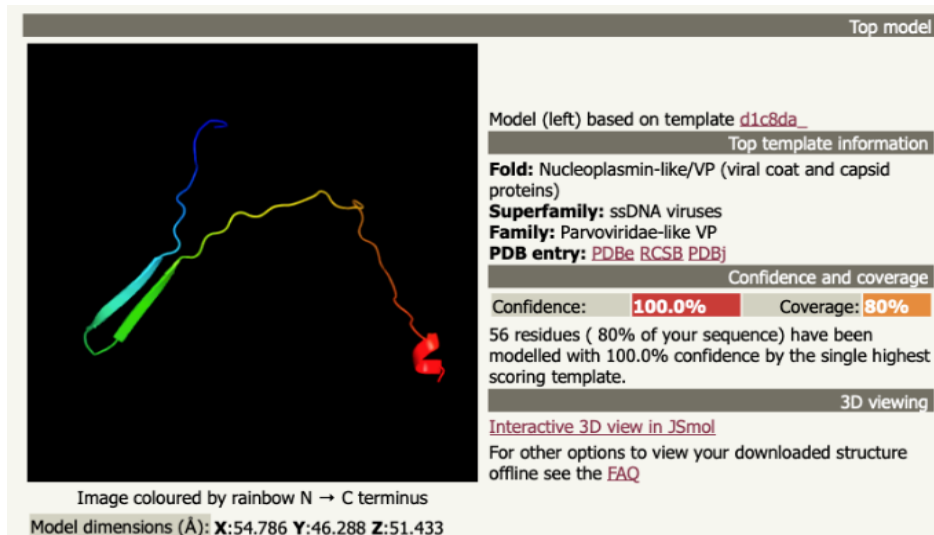
Gráfico 3. Hidrofobicidad correspondiente a los 80 aminoácidos del Péptido 3.

Finalmente se realizó una predicción de estructura de los péptidos por medio de la herramienta *Protein Homology/analogy Recognition Engine V 2.0 (Phyre²)*. Los resultados obtenidos se muestran en la **Figura 3 (a, b y c)**, que corresponden a los péptidos 1, 2 y 3 respectivamente.

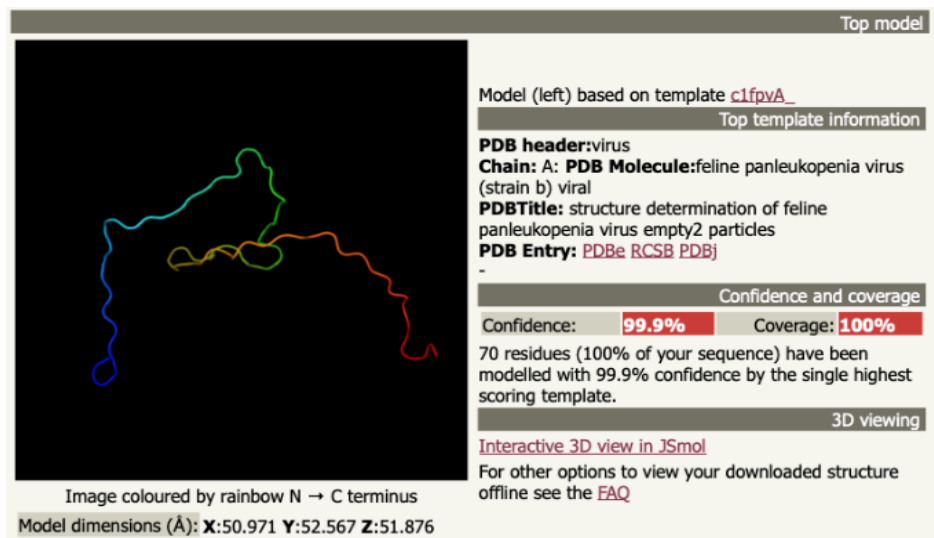
Como se puede observar en la **Figura 2, a**, correspondiente a la estructura del “Peptido 1”, éste fragmento proteico posee una estructura más compleja si se compara con los otros dos péptidos (**Figura 3, b y c**); posee dos estructuras láminas β -plegadas y una α -hélice en un extremo. Es sabido que una mayor complejidad estructural en los antígenos, potencialmente confiere una mayor inmunoestimulación. Con base en lo anterior el peptido podría representar un candidato útil para uso en una vacuna de ADN contra PVC tipo 2, debido a su complejidad estructural y estrecha relación con los tipos de PVC 2a, 2b y 2c (98.55 - 98.59%).

En el caso de los péptidos 2 y 3, el análisis de estructura no mostró la formación de estructuras secundarias (**Figura 3, b y c**), básicamente por la abundancia de prolinas que limitan la formación de hélices Alpha y glicinas que limitan la formación de hojas beta. Si bien esto sugiere una estructura menos diversa, no significa que no puedan ser antígenos eficaces para la prevención de parvovirus. La abundancia de residuos hidrófobos en ambos péptidos, podrían ser útiles en su interacción con proteínas (Moelbert, et al., 2004; Hagemans, et al., 2015).

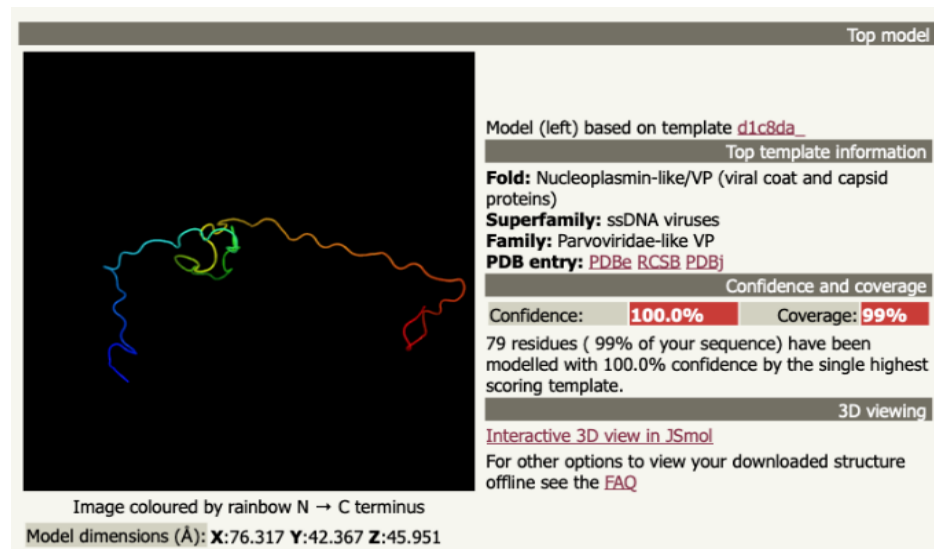
Figura 3. Predicción de las estructuras 3D de los péptidos 1 (a), 2 (b) y 3 (c), mediante la herramienta Phyre²



a) Primer segmento obtenido, (péptido 1) estructura 3D dotada con dos láminas β -plegadas y una α -hélice.



b) Péptido 2, no se observan estructuras secundarias.



c) Péptido 3, no se observan estructuras secundarias.

Trabajos citados

Dahiya, S., Saini, M., Kumar, P. & Gupta, P., 2011. An oral Sindbis virus replicon-based DNA vaccine containing VP2 gene of canine parvovirus delivered by *Escherichia coli* elicits immune responses in dogs. *Acta Virol*, 55(4), pp. 289-294.

Dahiya, S., Saini, M., Kumar, P. & Gupta, P., 2012. Immunogenicity of a DNA-launched replicon-based canine parvovirus DNA vaccine expressing VP2 antigen in dogs. *Research Veterinary Science*, Volumen 93, pp. 1089-1097.

Gupta, P. y otros, 2005. Cloning of Canine parvovirus VP2 gene and its use as DNA vaccine in dogs. *Current Science*, Volumen 88, pp. 778-782.

Hagemans, D., van Belzen, I., Moran Luengo, T. & Rüdiger, S., 2015. A script to highlight hydrophobicity and charge on protein surfaces. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 2(56), pp. 1-11.

Jiang, W. y otros, 1998. Nucleic acid immunization protects dogs against challenge with virulent canine parvovirus. *Vaccine*, 16(6), pp. 601-607.

Kelman, M., Barrs, V. R., Norris, J. M. & P, W. M., 2019. Canine parvovirus prevention and prevalence: veterinarian perceptions and behaviors. *Preventive Veterinary Medicine*, 5(174).

Kumar, S. y otros, 2018. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, Volumen 35, pp. 1547 - 1549.

Miranda, C. & Thompson, G., 2016. Canine parvovirus: the worldwide occurrence of antigenic variants. *Journal of General Virology*, Volumen 97, pp. 2043 - 2057.

Moelbert, S., Emberly, E. & Tang, C., 2004. Correlation between sequence hydrophobicity and surface-exposure pattern of database proteins. *Protein Science*, Volumen 13, p. 752–762.

Patial, S. y otros, 2007. Virus neutralizing antibody response in mice and dogs with a bicistronic DNA vaccine encoding rabies virus glycoprotein and canine parvovirus VP2. *Vaccine*, 25(20), pp. 4020-4028.

Saitou, N. & Nei, M., 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, Volumen 4, pp. 406 - 425.

Tamura, K., Nei, M. & Kumar, S., 2004. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, Volumen 101, pp. 11030 - 11035.

Tarpey, I. & Greenwood, N., 2001. Neil. United States Patent No. US6187759B1. *anine parvovirus DNA vaccination*.

Vasu, J. y otros, 2019. Comparative immune responses of pups following modified live virus vaccinations against canine parvovirus. *Veterinary World*, 12(9), pp. 1422 - 1427.

Zhou, P., Zeng, W., Zhang, X. & Shoujun, L., 2017. The genetic evolution of canine parvovirus – A new perspective. *PLoS ONE*, 12(3).

Anexo

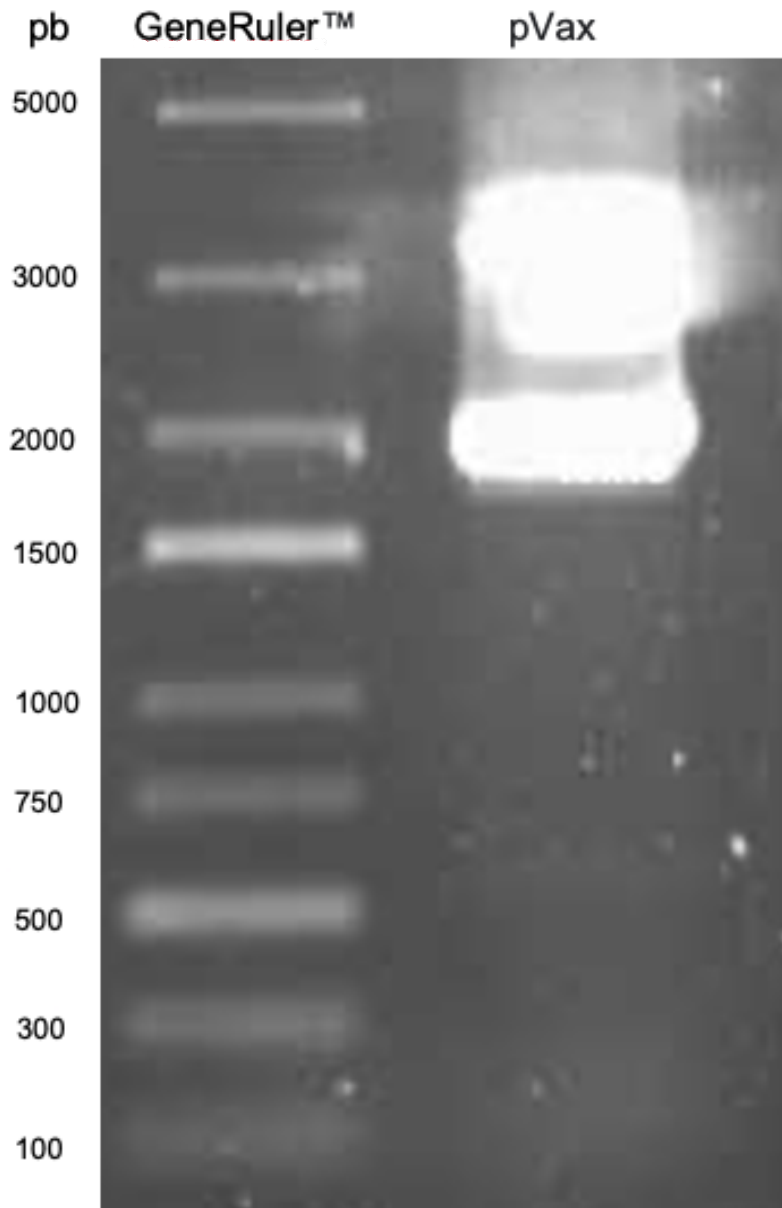


Figura 1. Se muestra el vector de clonación pVax recuperado, situado, tras la electroforesis en gel de agarosa (8%), entre los valores correspondientes a 2000 y 5000 pares de bases.