



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

POSGRADO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA
SALUD ANIMAL

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DEL GEN QUE CODIFICA PARA LA PROTEÍNA NS1 DE CEPAS DE INFLUENZA AVIAR MEXICANAS

PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS

Lucía Juliana Flores Gálvez

Tutora: Iris Estrada García

Comité tutorial:

Gary García Espinosa

Laura Cobos Marín

México DF 2009



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

DEDICATORIA

A la fortaleza de mi madre

A mis hermanos Gaby, Fabian, Sadda, Uriel, Kris, Binael por la hermandad que nos
une

y por todo lo que hemos pasado juntos

A mi padre que esta en el Nirvana †

A mi nueva familia, mi esposo Miguel y mi hijo Elías José por darme el animo para
terminar este trabajo y a mi orejas y yue

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por brindarme el apoyo necesitado

A la FMVZ-UNAM por otorgarme un espacio para trabajar

A los académicos por brindarme su conocimiento

A mi comité tutorial

A mi tutora

A la Dra. Sara y Escorcia por su tiempo, paciencia, enseñanza y todo el apoyo brindado

A todas las personas que sin conocerme me brindaron su apoyo

A mis sinodales por su tiempo para revisar este trabajo

A la familia Reyes Gómez

A Dios por estar siempre conmigo y nunca dejarme sola

RESUMEN

LUCIA JULIANA FLORES GALVEZ. Caracterización molecular del gen que codifica para la proteína NS1 de cepas de influenza aviar mexicanas Dra.: Iris Estrada García, Dr.: Gary García Espinosa, Dra. Laura Cobos Marín.

El virus de IA es un miembro de la familia *Orthomixoviridae* del cual existen 3 tipos A, B, C. El virus es envuelto de forma pleomórfica con un diámetro de 120 nm aproximadamente; su material genético consiste de 8 cadenas de ARN las cuales codifican para 10 proteínas: Hemaglutinina, neuroaminidasa complejo polimerasa (PB1, PB2 y PA), nucleoproteína (NP) proteína M1, M2. Proteína NS1 y NEP.

La NS1 es una proteína codificada por un RNAm colineal que consta de 230 aa, se sintetiza en el citoplasma y se trasloca al núcleo donde es fosforilada. Ésta se encuentra solo en células infectadas y consta de dos dominios: un dominio de unión al RNA de doble cadena que le confiere una propiedad antiviral y un dominio efector dentro de la región carboxilo. El empleo de vacunas contra IA en las parvadas disminuye el riesgo de que se presente un brote de alta virulencia; sin embargo, desde el punto de vista epidemiológico, dificulta los monitoreos serológicos para detectar anticuerpos dirigidos hacia virus vacunales o virus de campo. Debido a que esta proteína indica infección podría utilizarse para diferenciar aves infectadas de aves vacunadas. En este trabajo se amplificó la región correspondiente a NS1 de 10 cepas mexicanas, se secuenciaron y se hizo la predicción de epítomos con el fin de determinar si esta proteína podría emplearse en pruebas diagnósticas para diferenciar aves vacunadas de aves infectadas (DIVA). Se encontró que todas las cepas comparten un epítomo en la región amino terminal aún cuando presentan variaciones en su secuencia, por lo que puede sugerirse el empleo de la NS1 en pruebas diagnósticas, aunque habría que demostrar que las aves infectadas reconocen ese epítomo; además sería importante establecer si las variaciones encontradas tienen relación con la virulencia.

ABSTRAC

By.Lucia Juliana Flores Galvez. Molecular characterization of the gene that it codifies for protein NS1 of Mexican strains. Dra.: Iris Estrada García, Dr. Gary García Espinosa, Dra. Laura Cobos Marín.

Key Word: Influenza A virus,NS1 protein.

The influenza A virus are Orthomyxoviridae family, are classified as A,B and C. The virus is pleomorphic whit approximately 120nm in diameter. The genome of influenza consists of eight single- stranded negative sense RNA segments that encode 10 viral protein: Hemagglutinin, Neuroaminidase, Nucleo protein, matrix protein (M1 and M2), NS1 protein, NEP and tree subunits of viral polymerase (PB1,PB2 and PA)

The NS1 protein is translated from the colinear transcript of segment 8 and consist of 230 amino acid in length, it synthesizes in the cytoplasm and trasloca to the nucleus where she is fosforilada.

The NS1 protein posses two domain: RNA-bind domain at the N-terminus that confers a antiviral property and effector domain in the carboxy half. The NS1 protein is abundantly expressed in infected cell.

The vaccine use against IA in the parvadas ones diminishes the risk of which a bud of high virulence appears; nevertheless, from the point of view epidemiologist, it makes difficult the serologic monitorings to detect antibodies directed towards virus vacúnales or virus of field. Because this protein indicates infection could be used to differentiate infected birds from vaccinated birds. In this work the region corresponding to NS1 of 10 Mexican stocks was amplified, they were secuenciaron and the prediction was made of epitopes with the purpose of to determine if this protein could be used in diagnostic tests to differentiate vaccinated birds from infected birds (DIVA). One was that all the stocks share a epitope in the terminal amino region even though they present/display variations in his sequence, reason why can suggest the use of the NS1 in diagnostic tests, although it would be necessary to demonstrate that the infected birds recognize that epitope; in addition it would be important to establish if the found variations have relation with the virulence.

INDICE

Dedicatoria.....	I
Agradecimientos.....	II
Resumen.....	III
Abstrac.....	IV
Índice.....	V
Lista de imágenes y diagramas.....	VII
Lista de tabla.....	VIII
Abreviaturas y siglas.....	IX
1.0 INTRODUCCION.....	1
1.1 Características del virus.....	1
1.1.1 Vacunación contra IA en México.....	6
1.1.2 Técnicas para diferenciar aves infectadas de aves vacunadas (DIVA)....	6
1.1.3 Justificaciones.....	8
2.0Objetivos generales.....	9
2.1 Objetivos particulares.....	9
2.2 Hipótesis.....	10
3.0 MATERIALES Y MÉTODOS.....	11
3.1 Tamaño de muestra.....	11
3.1.1 Amplificación de NS1 a partir de cepas mexicanas.....	11
3.1.2 Extracción de ARN viral.....	11
3.1.3 Reacción de RT-PCR	11
3.1.4 Electroforesis.....	12
3.1.5 Purificación de productos de RT- PCR para su secuenciación.....	13

3.1.6 Secuenciación.....	13
3.1.7 Análisis de la secuencia.....	14
3.1.8 Alineación de secuencias.....	14
3.1.9 Predicción de epítomos, filograma.....	14
4.0 Resultados.....	15
4.1 Amplificación de NS1.....	15
4.2 Alineación.....	15
4.3 Análisis filogenético.....	17
4.4 predicción de epítomos.....	18
5.0 Discusión.....	19
6.0 Conclusiones.....	22
7.0 Literatura citada.....	23
8.0 Anexos.....	28
8.1 Imágenes.....	28
8.2 Tablas y diagramas.....	25
8.3 Graficas.....	43

LISTA DE IMÁGENES Y DIAGRAMAS

Imagen 1: Amplificación del gen NS1.....	28
Imagen 2: Banda de 719 pb correspondiente a cepas purificadas.....	28
Diagrama 1: Filógrama.....	31
Gráfica 1: Cepa AHidalgo_28159_232_94.....	43
Grafica 2: Cepa_referencia_28159_232_94.....	43
Grafica 3: Cepa: CPA6535_05A_Querétaro.....	44
Grafica 4: Cepa CPA1792_06A_Coahuila.....	44
Grafica 5: Cepa CPA85_06_Querétaro.....	45
Grafica 6: Cepa CPA2393_06A_Durango.....	45
Grafica 7: Cepa CPA2579_06A_Veracruz.....	46
Grafica 8: Cepa CPA6973_05_Durango.....	46
Grafica 9: Cepa CPA7637_05_Hidalgo.....	47

LISTA DE TABLAS

TABLA 1: Alineación de las secuencias del gen NS1.....	29
TABLA 2: Cepa: AHidalgo_28159_232_94	32
TABLA 3: Cepa de referencia_28159_232_94	33
TABLA 4: Cepa: CPA6535_05A_Querétaro.....	34
TABLA 5: Cepa: CPA1792_06_Coahuila.....	35
TABLA 6: Cepa: CPA85_06Querétaro.....	36
TABLA 7: Cepa: CPA6963_06ADurango.....	37
TABLA 8: Cepa: CPA2393_06A_Durango.....	38
TABLA 9: Cepa: CPAA2579_05_Veracruz.....	39
TABLA 10: Cepa: CPA7637_05_Hidalgo.....	40
TABLA 11: Valores Kolaskar y Tongaonkar de los Aminoácidos.....	41
TABLA 12: Epítomos que comparten las secuencias de las diferentes cepas..	42

ABREVIATURAS

Aa	Aminoácidos
ARNc	Acido ribonucleico celular
ARNm	Acido ribonucleico mensajero
ARN	Acido ribonucleico
ARNi	Acido ribonucleico de interferencia
CPA	Comisión México–Estados Unidos para la Prevención de la Fiebre Aftosa y otras enfermedades exóticas
CPSF	Factor específico de corte y poliadenilación
eIF46	Factor de iniciación eucariota
DIVA	<i>differentiate infected from vaccinated animals</i>
HA	Hemaglutinina
IA	Influenza Aviar
NA	Neuroaminidasa
NEP	Proteína de exportación nuclear
NP	Núcleo proteína
RNPnp	Ribo proteínas nucleares pequeñas
RT-PCR	Trascrición reversa de la polimerasa
TBE	Buffer Tris –EDTA

1.0 .- INTRODUCCIÓN

En Italia en el año de 1978 se describió por vez primera una enfermedad aguda que afectaba a aves domésticas ocasionando gran mortalidad a la que se le dio el nombre de “peste aviar”, Schafer demostró que ésta era causada por un miembro del virus de influenza del grupo A (12) que hoy se conoce como influenza aviar (IA) de alta patogenicidad (Perroncito *et a* 1878); años más tarde, en 1902 se aisló el primer virus de influenza A en aves (A/Chicken/Brescia/1902 (H7N7) y en 1933 se aísla el primero en humanos.

Las pandemias en humanos en los años 1957 y 1968 provocan intensos estudios del virus de influenza en animales con la finalidad de encontrar el origen de la misma, el estudio consistió en el aislamiento de cepas de IA tanto en aves domésticas como en aves silvestres y estas fueron cepas apatógenas (9,26). En Escocia se aislaron subtipos H5 que correspondían a cepas patógenas, estos hallazgos mostraron dos tipos de virus de Influenza basados en su virulencia: virus de alta patogenicidad que causan una enfermedad severa en aves y virus de baja patogenicidad que causan una enfermedad leve o asintomática.

1.1.-CARACTERISTICAS DEL VIRUS

El virus de IA está clasificado como un miembro de la familia *Orthomixoviridae* y de acuerdo con las características antigénicas de la nucleoproteína (NP) y de la proteína de matriz se clasifica en tipo A,B,C, y de acuerdo con las proteínas de superficie, hemaglutinina (HA) y neuroaminidasa (NA) en subtipos, existiendo así 16 HA y 9 NA. El virus posee una envoltura que adquiere de la célula huésped y visto por microscopía electrónica tiene una forma pleomórfica con un diámetro de 120 nm aproximadamente; su material genético consiste de 8 cadenas de ARN de polaridad negativa las cuales codifican para un total de 10 proteínas:

El segmento 4 codifica para la hemaglutinina, una glicoproteína de superficie que se adhiere a la célula huésped mediante residuos de ácido síalico que actúan como receptores celulares y se encuentran en glicoproteínas y

glicolípidos de la membrana celular de todas las células; la hemaglutinina interviene en la entrada del virus a la célula huésped mediante el corte del puente disulfuro que une a las subunidades HA1 y HA2 que se encuentran en el precursor HA0, este corte es importante para la infección y determina la patogenicidad viral y el tropismo a tejidos (2). La neuroaminidasa, codificada por el segmento 6 es una glicoproteína de superficie que tiene actividad sialidasa, ésta libera al virus de los residuos de ácido siálico para que el virus infecte otra célula (27).

La transcripción y la replicación de los ocho segmentos del virus de IA es catalizada por una ARN polimerasa dependiente de ARN, ésta es un complejo de 3 moléculas codificadas por tres segmentos de ARN: el segmento uno codifica para la proteína PB1, el segmento dos para PB2 y el segmento tres para PA (7).

PB1 es la subunidad que contiene un motivo conservado y se caracteriza por ser una RNA polimerasa dependiente de RNA (7) que se une al RNA_v (viral) y al RNA_c (celular) además de tener actividad de endonucleasa que es requerida para cortar el Cap de los RNAm celulares y utilizarlos como iniciadores para la transcripción de RNAm virales (7). PB2 reconoce y se une al Cap de los RNAm celulares mientras que la función de PA no es muy clara pero se cree que participa en la transcripción y en la replicación.

La nucleoproteína es codificada por el segmento cinco y está asociada con las tres subunidades de la polimerasa viral, esta asociación forma el complejo ribonucleoproteína (RNP) que participa en la replicación de RNA y la transcripción (33).

El segmento siete codifica para la proteína M1 y M2, la proteína M2 se encuentra dentro del virus (30), está formada por tetrámeros y constituye canales de iones de H⁺ que son activados por un pH bajo en el endosoma, lo que facilita la pérdida de la envoltura del virus para insertar su material genético en el citoplasma de la célula infectada. La proteína M1 se encuentra debajo de la envoltura viral y le brinda rigidez a la partícula viral además de ayudar al ensamble de nuevas partículas virales ya que interactúa con la nucleocapside y la cara interna de la membrana plasmática de la célula hospedera (33). El octavo segmento de ARN de IA codifica para dos proteínas NS1 y NEP.

NS1 es codificada por un ARNm colineal mientras NEP es codificada por un RNAm alternativo después del corte y empalme. NS1 es una proteína de 230 aa que se sintetiza en el citoplasma y se trasloca al núcleo donde es fosforilada para convertirse en una proteína activa. (20) Esta se fosforila en los residuos de treonina y cada molécula de la proteína NS1 tiene dos sitios de fosforilación.

La proteína NS1 consta de dos dominios:

Un dominio de unión al ARN de doble cadena que se compone de los primeros 73 aa de la proteína y que le confiere una propiedad antiviral al unirse al ARN de doble cadena, el sitio de unión y el efecto antiviral de NS1 fueron demostrados por Min y Drug 1998 al generar un virus de IA recombinante que expresaba la proteína NS1 con una mutación en el aminoácido 38 cambiando arginina (R) por alanina (A) y observar que la unión de NS1 al ARNdc protege al virus de un estado antiviral inducido por el IFN- β en el que interviene la 2'5' oligo adenilato sintetasa, vía síntesis de RNAsa L (14). Este dominio además inhibe el corte y empalme de los ARNm a través de la unión al U6 RNPnp (ribo nucleoproteínas nucleares pequeñas) del enpalmosoma (21,31).

La proteína NS1 tiene un dominio efector dentro de la región carboxilo terminal, que consta de 28 aa aproximadamente (del aminoácido 134 al 161) (6,8). figura 1

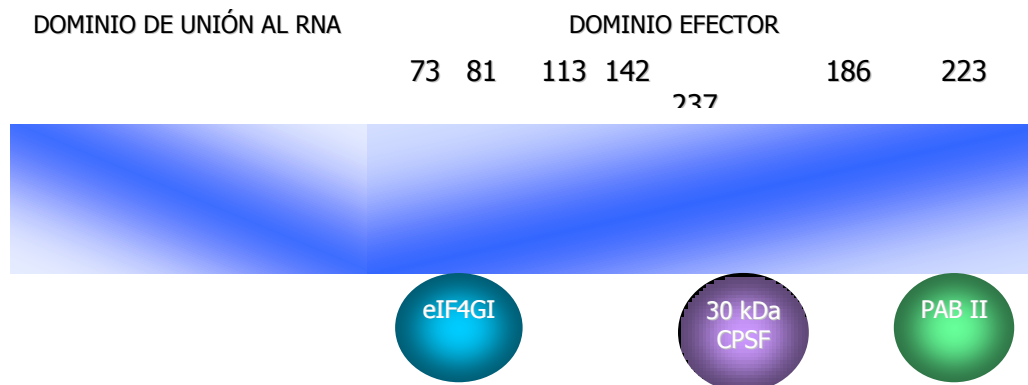


Fig 1: Sitios de unión de proteínas celulares a los dominios de la proteína NS1

CPSF: factor específico de corte y poliadenilación; eIF4G: factor de iniciación eucariota; PABII: proteína de unión a poli A.

El dominio efector de la proteína NS1 inhibe la exportación de ARNm celulares a través de la unión de la subunidad de 30 kDa del factor específico de corte y poliadenilación (CPSF) y a la proteína PABII que elonga las colas de poli A de ARNm. PABII se une al factor específico de corte y poliadenilación (CPSF) una vez que este ha procesado el 3' final de los ARNm celulares y elonga la cola de poli A de los mismos. NS1 al unirse a CPSF inhibe el corte del 3' final de ARNm celulares(12). Chen y colaboradores (6,8) demostraron que a pesar de que NS1 se une a CPSF, algunos ARNm celulares son procesados y PABII puede elongar las colas de poli A de éstos, NS1 al interactuar con PABII bloquea la elongación de 3' final de colas de poli A de los pre ARNm celulares originando la acumulación de ARNm celulares con una cola corta de poli A en el núcleo de células infectadas con virus de IA y de esta manera se inhibe la exportación de los ARNm celulares que contienen cola de poli A.La siguiente figura muestra la interacción de NS1 con CPSF Y PABII (6,8)

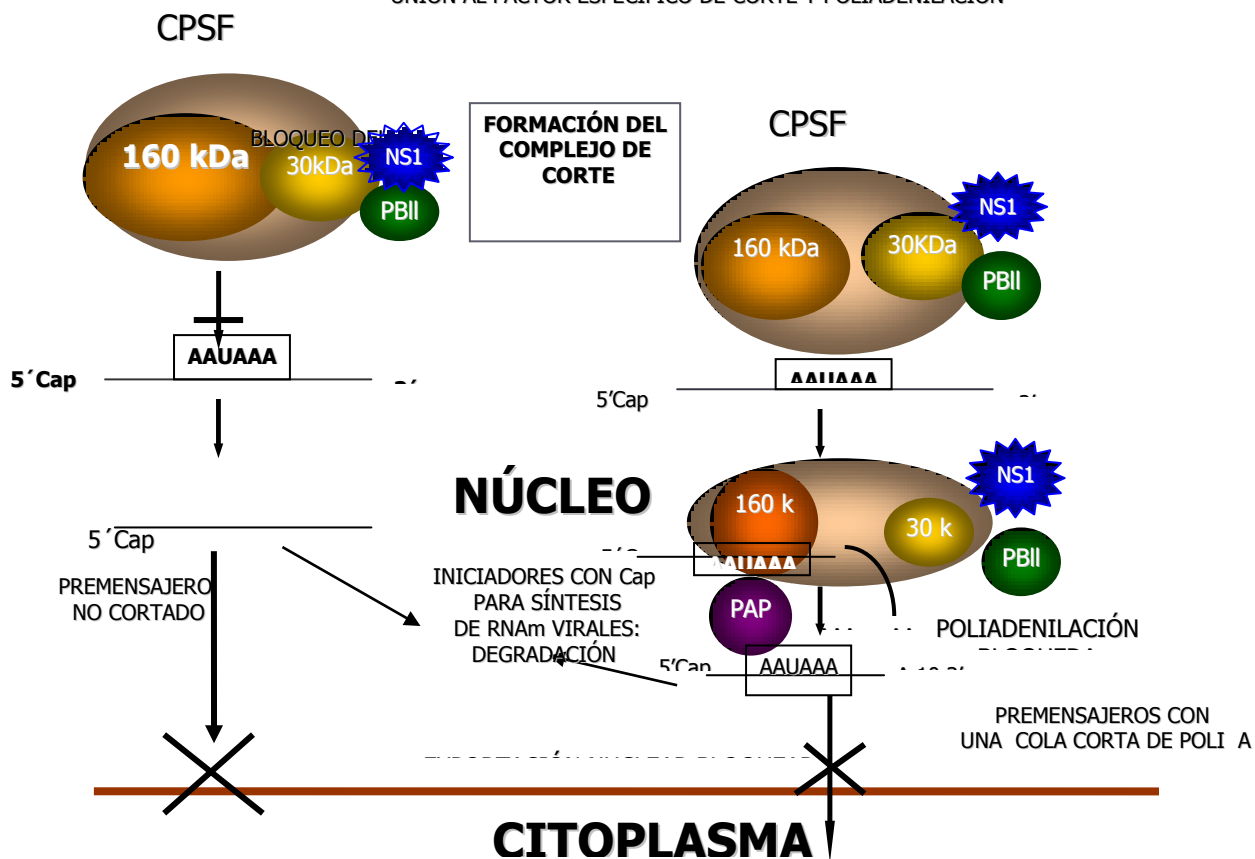


Fig 2. Dos mecanismos se han propuesto en los cuales la proteína NS1 inhibe el procesamiento del 3' final en células infectadas: Mecanismo 1: NS1 se une a la sub unidad de 30kDa del CPSF evitando de esta manera que CPSF se una a la secuencia AAUAAA de algunos pre RNAm celulares por lo que el corte del 3' final de pre RNAm no es llevado a cabo. Los pre RNAm no cortados permanecen en el núcleo. Mecanismo II: CPSF se une a la secuencia AAUAAA de otros pre RNAm a pesar de que NS1 se une a PABII y a la subunidad de 30 kDa del CPSF. Una corta secuencia de poli A es adicionada a los pre RNAm cortados por PAP en una reacción dependiente de CPSF. Subsecuentemente la elongación de la secuencias de poli A es bloqueada por la unión de NS1 a PABII, resultando en la acumulación nuclear de pre RNAm que contienen colas cortas de poli A.

Influenza A virus NS1 protein targets poly (A)-binding protein II of the cellular 3'-end processing machinery Chen,Z. Li,Y. and KrugM,R. The EMBO journal Vol.18 No.8 pp.2273-2283, 1999.

El factor de iniciación eucariota 4GI (eIF4GI) se une a la proteína NS1, esta interacción promueve el reclutamiento de complejos de iniciación de la traducción de RNAm (1).

Se ha demostrado que la proteína NS1 puede inhibir el sistema inmune adaptativo ya que interviene en la maduración y en la capacidad de las células dendríticas humanas para inducir una respuesta mediada por células T. (25) Actúa suprimiendo el sistema de ARN de interferencia ya que se une a los pequeños RNA de interferencia (RNAi) (3)

Se ha demostrado que la proteína NS1 puede inhibir el sistema inmune adaptativo ya que interviene en la maduración y en la capacidad de las células

dendríticas humanas para inducir una respuesta mediada por células T. (25) Actúa suprimiendo el sistema de RNA de interferencia ya que se une a los pequeños RNA de interferencia (RNAi) (3).

1.1.1.- VACUNACIÓN CONTRA IA EN MÉXICO

Los primeros brotes reconocidos en México de IA se dieron en 1994 a partir de esta fecha se inicia la vacunación de las parvadas contra dicha enfermedad. La cepa vacunal utilizada fue A/Chicken/México/CPA/232/94(H5N2) y se elaboraron dos vacunas inactivadas, una absorbida en hidróxido de aluminio y otra emulsionada en aceite; actualmente según la norma Oficial Mexicana NOM-044-ZOO-1995 está autorizada la aplicación de la vacuna inactivada emulsionada y la vacuna recombinante viruela-influenza aviar, ambas del subtipo H5(11). Si bien el empleo de estas vacunas ha permitido un control de la enfermedad en México, se sabe que las aves vacunadas pueden infectarse con virus de campo y diseminarlo en el medio ambiente.

1.1.2 -TÉCNICAS DIVA (De sus siglas en inglés: *differentiate infected from vaccinated animals*)

El empleo de vacunas contra IA en las parvadas se justifica para disminuir el riesgo de que se presente un brote de alta virulencia; sin embargo, desde el punto de vista epidemiológico tiene la desventaja de que dificulta la realización de monitoreos serológicos para detectar anticuerpos dirigidos hacia virus vacunales o virus de campo.

Para distinguir aves vacunadas de aves infectadas con IA se han propuesto algunos sistemas basados en la detección de anticuerpos contra la proteína NS1 debido a que ésta se sintetiza en una etapa temprana de la replicación viral y no se incorpora al virión, por lo que podría utilizarse como un indicador de la replicación viral (4). Un estudio realizado por Dundon *et al.* 2005. en el que anticuerpos contra NS1 en sueros de caballos y ratones infectados con virus H3N8 fueron probados contra sueros de caballos vacunados con virus inactivados de IA en una prueba de ELISA utilizando una proteína NS1

recombinante, demostraron que esta prueba podría ser utilizada para distinguir caballos vacunados con virus inactivados de caballos infectados (20).

En México podría utilizarse una estrategia semejante, ya que las vacunas inactivadas no deberían de generar respuesta inmune hacia esta proteína; sin embargo, en un estudio realizado con aislamientos de virus H7N1 y H7N3 para determinar la variabilidad de NS1 se demostró que la NS1 del virus H7N1 tuvo truncaciones en la región carboxilo terminal, principalmente en los virus de alta virulencia y sugiere además que el sitio truncado es inmunogénico (8).

1.1.3.- JUSTIFICACIÓN

La importancia de estudiar la proteína NS1 es verificar si existen o no modificaciones en su secuencia que pudieran contribuir a cambios antigénicos que interfieran con el empleo de técnicas diva (Técnica para diferenciar aves vacunadas de aves infectadas).

2.0- OBJETIVO GENERAL:

1) Analizar la secuencia correspondiente a la NS1 de aislamientos mexicanos de IA.

2.1.- OBJETIVOS PARTICULARES:

1.- Amplificar el gen de NS1, mediante la técnica de RT-PCR; para comparar las secuencias de distintos aislamientos clínicos y la cepa de referencia.

2.- A partir de las secuencias obtenidas hacer la predicción de epitopes , para determinar posibles variables antigénicas que pudieran interferir en el desarrollo de pruebas DIVA

2.2-. HIPÓTESIS:

Los virus aislados de IA en México presentan modificaciones en la secuencia del gen que codifica para la proteína NS1 en comparación con la cepa de referencia (A/chiken/Hidalgo726654-1368/1994)

3.0.- MATERIAL Y METODOS

3.1.- Tamaño de muestra

Se trabajó con 10 aislamientos del virus de Influenza Aviar, proporcionados por la Comisión México – Estados Unidos para la Prevención de la Fiebre Aftosa y otras enfermedades exóticas (CPA)

3.1.1.- AMPLIFICACIÓN DE NS1 A PARTIR DE CEPAS MEXICANAS

3.1.2.- Extracción de ARN viral:

Se realizó la extracción del ARN viral utilizando la técnica de TRIzol® (Número de catálogo 15596-026) En un tubo de 1.5 ml se colocaron 200 ul de líquido alantoideo y se le adicionaron 800 ul de trizol se incubó 10 minutos a temperatura ambiente sin homogeneizar, se centrifugó a 15.7 gpm 10 minutos a 4 °C, se recuperó el sobrenadante y se homogenizó por inversión, se incubó 5 minutos a temperatura ambiente, se adicionaron 200 ul de cloroformo y se homogenizó 15 segundos en vortex, para posteriormente incubarse 3 minutos a temperatura ambiente, se centrifugó a 1300 rpm 15 minutos a 4 °C y la fase acuosa se transfirió a un nuevo tubo al cual se le agregaron 500 ul de isopropanol y se incubó 15 minutos a temperatura ambiente, se centrifugó nuevamente a 15.7 gpm 15 minutos a 4 °C el sobrenadante se decantó y se le agregó 1ml de etanol se centrifugó como se indicó anteriormente y se decantó el sobrenadante el botón se dejó secar a temperatura ambiente 20 minutos, posteriormente se resuspendió en un volumen de 15 ul .

3.1.3.- RT-PCR:

El ARN se amplificó mediante la técnica RT-PCR con los siguientes iniciadores específicos diseñados en el laboratorio de virología de la FMVZ con el programa disponible en PUBMED (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 5' TCT ATG GCA CAT ACG AAA 3' (sentido) y 5' CTG CTC GAA GCTA TTC TC 3' (reversa) que amplifican un total de 719 pb.

La reacción de RT-PCR se efectuó mediante el paquete comercial Invitrogen Super Script™ One Step RT-PCR with Platinum® Taq (Número de catálogo 10928-042). Las condiciones del RT-PCR comprendieron: RT un ciclo de 42° 30 minutos, 95° cinco minutos y las condiciones de PCR comprendieron 35 ciclos iniciando con una desnaturalización de 95°,30 segundos, la alineación a 52°,30 segundos, extensión 72° un minuto y una extensión final de 72° siete minutos. Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador Techen (TC-312/FTC3102D)

3.1.4.- Electroforesis

Se llevó a cabo en una cámara vertical (Gibco BRL) utilizando un gel de agarosa al 1.5 % que corrió durante 60 minutos a 75 volts, posteriormente se tiñó en bromuro de etidio (1ug/ml) Las bandas de ADN fueron visualizadas en un transiluminador UV. Se utilizó un marcador de tamaño molecular de 1 Kilobase Plus DNA lader (GIBCO BRL 10787-018)

3.1.5.- Purificación de productos de RT-PCR para su secuenciación:

El material que se obtuvo con la técnica de RT-PCR, se colocó en un gel de agarosa al 1% el cual fue corrido durante 45 minutos, las bandas visualizadas que correspondían a 719 pb se cortaron y purificaron con el paquete comercial QIA quick gel extraction® (Número de catálogo 01-28704). Las bandas cortadas se pesaron y se colocaron en un tubo de 1.5 ml al cual se le agregó tres volúmenes de buffer QG la muestra se incubó durante 10 minutos a 50° C, una vez disuelta la agarosa se le agregó un volumen de isopropanol y se homogenizó, la mezcla se colocó en una columna y esta se metió a un tubo colector el cual se centrifugó a 15.7 gpm durante un minuto, la columna se lavó colocando 0.750 ml de buffer PE se incubó 5 minutos y se centrifugó un minuto dos veces, el ADN se recuperó adicionando 35 µl de agua miliQ en el centro de la membrana de la columna y esta se colocó en un tubo nuevo se centrifugó un minuto a 15.7 gpm el ADN se guardó a 80° C hasta su utilización.

3.1.6.- Secuenciación:

La secuenciación se realizó en la Unidad de Secuenciación e Identificación de Polimorfismos, con el método de terminadores. Secuenciador Automático 3100 Genetic Analyzer. De Applied Biosystems™. Las secuencias se hicieron en la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular UNAM.

3.1.7.- Análisis de Secuencias:

El análisis de las secuencias se efectuó con el programa Sequencer 4.7 DNA Sequence Analysis Software, Gene Codes Corporation 775 Technology Drive Suite 100A Ann Arbor, MI 48108 U.S.A.

3.1.8.- Alineación de Secuencias:

Las secuencias se alinearon y se compararon con el fin de determinar el porcentaje de homología del virus así como la relación filogenética de las mismas, mediante la utilización del programa Meg Align program Clustalw alignment algorithm y Software DNASTAR, Inc. 3801 Regent Street Madison, WI 53705 U.S.A.

3.1.9.- Predicción de epitopes, filograma

3.1 Para este análisis se realizó la traducción de nucleótidos a aminoácidos (aa) con el programa que puede ser utilizado a partir de la página web:

www.expasy.ch/tools

La predicción de epítopes se realizó usando el método Kolaskar y Tongar (1990). Este programa se encuentra disponible en la red, en la página electrónica:IEDB-AR. <http://tools.Immuneepitope.org>.

4.0.- RESULTADOS

4.1.- Amplificación de NS1

La amplificación por RT-PCR del gen NS1 generó una banda de 719 pb en los 10 casos estudiados. La imagen 1 y 2 muestra un gel de agarosa al 1.5% donde se identifica una banda de 719 pb.

4.2.- Alineación

Se utilizó como secuencia consenso: A/Hidalgo/28159/232/94, la cual fue obtenida a partir del banco de datos PUBMED (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)

La alineación se realizó en 11 cepas de las cuales presentaron secuencias incompletas

De acuerdo a lo observado, las primeras variaciones pueden apreciarse dentro de la región que codifica para los primeros 100 aa de las cepas identificadas como CPA6973_05_Durango, CPA2579_06_AVeracruz, CPA7637_05 e Hidalgo, en las cuales, en la posición 50 se aprecia el cambio de una prolina (P) por una treonina (T) estas mismas cepas presentan cambio en la posición 59 de una serina (S) por una Isoleucina (I). Hacia el extremo carboxilo terminal, la variación de algunas secuencias es más evidente, como es el caso en las cepas CPA6794_05A_Jalisco, CPA3739_05ACoahuila, CPA7637_05Hidalgo, CPA1792_06ACoahuila, CPA2393_06A_ Durango. En el extremo carboxilo terminal, las cepas en general presentan diferentes variaciones.

De acuerdo con las secuencias de los aa 150 al 190 se pudieron distribuir en 4 grupos las diferentes cepas:

Grupo 1:

- CPA3739_05_ACoahuila
- CPA6794_05_AJalisco
- A_Hidalgo_28159_232_94
- CPA2579_06A_Veracruz
- CPA6973_05_Durango

Grupo:2:

- Cepa de referencia_28159_232_94
- ,CPA7637_05_Hidalgo

Grupo 3:

- Cepa6535_05A_Queretaro,
- CPA85_06_Querétaro

Grupo 4:

- Cepa CPA2393_06A_Durango

Empleando las secuencias del carboxilo terminal (aa 190 al 230) las cepas también se agruparon en 4 grupos diferentes:

Grupo 1:

- CPA3739_05A_Coahuila,
- CPA6794_05A_Jalisco,
- A_Hidal_28159_232_94

Grupo 2:

- CPA2579_06A_Veracruz,
- CPA6973_05_Durango

Grupo 3:

- CPA7637_05Hidalgo
- CPA6535_05A_Querétaro,

- CPA85_06_Querétaro,
- CPA1792_06A_Coahuila,
- CPA2393_06A_Durango

Grupo 4:

- Cepa_referencia_28159_232_94

4.3.- Análisis filogenético

El análisis filogenético del gen NS1 muestra tres ramificaciones principales a partir de un ancestro en común a partir de estas existen otras como se menciona posteriormente.

La primera ramificación sufre una primera división que da la formación de dos ramas una que agrupa únicamente a la cepa CPA2393_06A_Durango y otra rama que se divide nuevamente originando dos grupos, una de las ramas conserva el grupo formado por las cepa de referencia y la cepa A_Hidalgo_28159_2394, la otra rama se subdivide y forma dos grupos en uno se encuentra las dos cepas Querétaro y en el otro la cepa CPA3739_Coahuila.

Ver diagrama 2

En la tercera ramificación se encuentra la cepa CPA2579_Veracruz esta es la cepa mas alejada del grupo. La cepa A_Hidalgo_28159_2394 y la cepa Veracruz son las cepas que se encuentran en los extremos del filógrama y ambas son muy cercanas a la cepa ancestral. (Diagrama 2)

4.4.- Predicción de epítomos

La predicción de epítomos se realizó en nueve de las 11 cepas secuenciadas, dos de las cuales se descartaron por presentar sus secuencias incompletas lo cual podría resultar en epítomos alterados.

La cepa A_Hidalgo_28159_2394 tiene un total de 230 aa, su propensión antigénica es de 1.010 y cuenta con 8 determinantes antigénicos. (Tabla 2) El sitio más antigénico de la proteína se encuentra entre los 100 y 150 aa. (Grafica 1)

La cepa de referencia_28159_232_94 tiene un total de 224 aa y una propensión antigénica de 1.011 y cuenta con 8 determinantes antigénicos. (Tabla 3). El sitio más antigénico de la proteína se encuentra entre los 100 y 150 aa (grafica 2)

La cepa CPA6535_05_Querétaro tiene un total de 217aa y una propensión antigénica de 1.017 y cuenta con 7 determinantes antigénicos. (Tabla 4). El sitio más antigénico de la proteína se encuentra entre los 100 y 150 aa. (Grafica 3)

La cepa CPA1792_06A_Coahuila tiene 214 aa y una propensión antigénica de 1.013 y cuenta con 7 determinantes antigénicos. (Tabla 5). El sitio más antigénico de la proteína se encuentra entre los 100 y 150 aa. (Grafica 4)

Cepa CPA85_06_Querétaro tiene 209 aa y una propensión antigénica de 1.016 y cuenta con 8 determinantes antigénicos. (Tabla 6). El sitio más antigénico de la proteína se encuentra entre los 100 y 150 aa. (Grafica 5)

Cepa CPA 6973_05_Durango tiene 210 aa y una propensidad antigénica de 1.07 y cuenta con 7 determinantes antigénicos. (Tabla 7). El sitio mas antigénico de la proteína se encuentra entre los 100 y 150 aa. (Grafica 6)

Cepa CPA2393_06_Durango tiene 220 aa y una propensidad antigénica de 1.005 y cuenta con 6 determinantes antigénicos. (Tabla 8). El sitio mas antigénico de la proteína se encuentra entre los 100 y 150 aa. (Grafica 7)

Cepa CPA2579_06A_Veracruz tiene 221 aa y una propensidad antigénica de 1.008 y cuenta con 8 determinantes antigénicos. (Tabla 9). El sitio mas antigénico de la proteína se encuentra entre los 100 y 150 aa. (Grafica 8)

Cepa CPA7637_05Hidalgo tiene 219 aa y una propensidad antigénica de 1.007 y cuenta con 7 determinantes antigénicos (Tabla 10). El sitio mas antigénico de la proteína se encuentra entre los 100 y 150 aa. (grafica 9)

En conclusión, el análisis filogenético muestra que las secuencias obtenidas de los diversos virus aislados varían en su cercanía filogenética, aun si estos fueron aislados en la misma zona

5.0.- DISCUSIÓN

En este trabajo se secuenció el gene que codifica para la proteína NS1 de diez aislamientos de virus influenza aviar de diferentes estados de la república mexicana. Con estos datos se realizó un análisis filogenético y también se hizo la predicción de epítopes. El análisis filogenético muestra que las secuencias obtenidas de las cepas trabajadas varían en su cercanía aun si estos fueron aislados en la misma zona.

El análisis muestra que la región más conservada de la proteína NS1 corresponde a la zona amino terminal donde se encuentra el dominio de unión al RNA, el cual protege al virus de un estado antiviral, estos hallazgos coinciden con Li Z. et al, 2006 quienes reportan que esta región es muy conservada; es importante señalar que en ese mismo trabajo se menciona que cambios en 2 o mas aa básicos, específicamente, en la posición 38 o 41 afectan la virulencia del virus en ratones, sería importante hacer estudios para evaluar si los cambios encontrados en nuestro trabajo podrían asociarse a el aumento o disminución de la virulencia de las cepas de IA en las aves.

La región central de la proteína es mas conservada que la zona carboxilo terminal, ya que en esta se encuentra el dominio efector que va del aa 134 al 161 el cual interviene en el secuestro del RNAm celular favoreciendo el procesamiento de los RNAm del virus (6, 8). El filograma muestra los resultados de la alineación, las secuencia de las cepas si difiere unas de otras formando tres grupos pero todas provienen del mismo ancestro y la cepa mas distante es la cepa Veracruz y la cepa A_Hidalgo_28159_2394 que se encuentran en los extremos del filograma pero son las cepas mas cercana a la cepa ancestral y cepa CPA3739_Coahuila es la cepa mas distante del la cepa

ancestral, la segunda cepa mas distante es la cepa de referencia esto podría deberse a que ha sufrido varios pases en embrión de pollo por lo cual las mutaciones o deleciones están presentes.

La alineación y el análisis de la secuencia de las nueve proteínas NS1 a las que se les hizo predicción de epítomos muestra que los primeros 73 aa en la región amino terminal presentan al menos un epítomo en común que es el TLGLDL,(tabla 12) esto abre la posibilidad de que los animales infectados puedan generar anticuerpos contra esta región; aún cuando otros epítomos son compartidos por todas las cepas, el epítomo KIAIASSPAPRY se presenta en el 100 % de las cepas secuenciadas pero con algunas modificaciones en su secuencia como aumento de aa al inicio IL o al final LPIAVHYE del péptido, los aa KIAIASSPAPRY se conserva en todas las secuencias, el aumento de aa ya sea al inicio o al final del epítomo podría no afectar de manera considerable al reconocimiento de este por el anticuerpo ya que un epítomo puede estar formado de 4-8 aa y la región conservada del epítomo es de 12 aa, finalmente el resto de las cepas presentan epítomos diferentes: la cepa CPA6535_05A_Querétaro tiene el epítomo IVEDVLKS y el epítomo LKIAIASSPAPR, la cepa CPA7637_05Hidalgo presenta el epítomo KIVESVLK en lugar del epítomo LKIAIASSPAPR y la cepa CPA2579_06A_Veracruz solo comparte el epítomo TLGLDL siendo la mas diferente de todas las demás secuencias.

En la región carboxilo terminal no se observó ningún epítomo común. Los epítomos identificados fueron únicos para cada cepa, lo cual indica que en este extremo la variación es mayor. A pesar de que la región amino terminal de la proteína es mas conservada y las secuencias tienen dos epítomos en común,

las graficas muestran que la parte de la proteína con mayor propensidad antigénica se encuentra entre los aa 100 y 150 donde se ubica el dominio efector, aunque las secuencia no presentan epítopes en común en esta zona, esta propensidad antigénica se debe a que la mayoría de los aa presentes en los epítopes tienen valores altos según el método Kolaskar & Tongaonkar(1990) en la que algunos aa tienen valores mayores de 1.00 como la Alanina (A),Cisterna (C), Fenilalanina (F) entre otros. Además secuencias de proteínas con aminoácidos hidrofobicos como la cisteina(C), leucina (L) y valina (V) presentes en estas tienden a ser sitios antigénicos (15)

Los determinantes antigénicos presentes en las secuencias de la proteína NS1 no aseguran que los anticuerpos de aves infectadas se unan a estos por lo cual habría que determinar que tan eficaces son los anticuerpos para reconocer a esto sitios y que sitios son mas reconocidos además de que tan inmunogena es la proteína comparada con otras proteínas del virus y si esta proteína se podría utilizar para establecer pruebas que diferencien aves vacunadas de aves infectadas en la Republica Mexicana para lo cual se necesitan hacer estudios que involucren sueros con anticuerpos sobre esta proteína.

6.0.- CONCLUSIONES

1.- La secuencia del gen que codifica para la proteína NS1 presenta cambios en algunos nucleótidos lo que altera la secuencia de aminoácidos confirmando la hipótesis planteada

2.-Los cambios en la secuencia de la proteína NS1 ocasionan diversidad y variaciones en el número de determinantes antigénicas de cada cepa.

3.-La mayoría de las variaciones en la secuencia de la proteína NS1 se encuentran en el extremo carboxilo terminal seguido por la región central de la proteína y la región del amino terminal es la mas conservada

4.-La proteína NS1 al no estar en la superficie del virus como la hemaglutinina o neuroaminidasa y ser una proteína no estructural se pensaría que la secuencia de la misma es conservada, sin embargo en este estudio se encontró que la secuencia de esta proteína no es conservada por lo que habría que determinar si las variaciones en su secuencia interfieren en el empleo de técnicas DIVA por lo que es necesario realizar mas estudios.

5.- Hay estudios que muestran que cambios en la proteína NS1 están ligados al aumento o disminución de patogenicidad y rango de hospedero, habría que determinar si sucede lo mismo en cepas mexicanas.

7.0.- LITERATURA CITADA

- 1.- Aragon,T. De la Luna,S.Novoa,I.Carrasco,L. Ortiz,J.Nieto,A. 2000. Eukaryotic Translation Factor 4GI Is a Cellular Target for NS1 Protein, a Translational Activator of influenza Virus. *Molecular and Cellular Biology*.20:17:6259-6268.
- 2.-Böttcher.E .Matrosovich,T. Beberle,M.Klenk,D,H. Garten,W. and Matrosovich,M. 2006 Proteolytic Activation of Influenza Viruses by Serine Proteases TMPRSS2 and HAT from Human Airway Epithelium.80:19:9896-9898
- 3.-Bucher E, Hemmes H, Goldbach R, Prins R. The influenza A virus NS1 protein binds small interfering RNAs and suppresses RNA silencing in plants. *J Gen Virol* 2004 85:983-991
- 4.-Capua,I.,Terregino,C.Cattoli,G. Mutinelli,F., Rodríguez,JF.,2002 Development of a DIVA (Differentiating Infected from Vaccinated Animals) strategy using a vaccine containing a heterologous neuraminidase for the control of avian Influenza.*Avian Pathol*.32, 47-55
- 5.-Chen.Z,Li. Y and Krug.M.R.1999. Influenza A virus NS1 protein targets poly (A)-binding protein II of the cellular 3' end processing machinery. *The EMBO journal* 18:2273-2283.
- 6.- Chien.C. Xu. Y. Xiao.R, Aramini.M.J 2004 Bioophysical Characterization of the Complex between Double-Stranded RNA and the N-Terminal Domain of the NS1 Protein from Influenza A Virus: Evidence for a Novel RNA-Binding Mode.*Biochemistry*.43:1950-1962.
- 7.- Deng,T.Sharps.J.Fodor ,E. and Brownlee,G.G.2005 In Vitro Assembly of PB2 with a PB1-PA Dimer Supports a New Model of Assembly of

Influenza A Virus Polymerase Subunits into a Functional Trimeric Complex Journal of Virology 79:1:8669-8674

8.- Dundon.G.W,Milani,Cattoli.G,Capua.I2006.Progressive truncation of the Non-Structural 1 gene of H7N1 avian influenza viruses following extensive circulation in poultry .Virus Res.94186:1-6

9.- Hinshaw,V,S,R.G. and R.G. Webster. And B.Turner.1980.The perpetuation of orthomixoviruses and paramixoviruses in Canadian waterfowl.Can.J.microbiol-26:622-629.

10.-Hale B G, Barclay S W, Randall E R, Rusell J R Structure of an avian influenza A virus NS1 protein effector domain. 2008 Virology. 378: 1-5

11.Flores,H.Villareal,C.Flores,C.García,G.López,H.Medina,A.Solís,S.Rivera,C.1997.La influenza aviar en México Memorias SAGAR

12.-Horimoto,T. and Kawaoka,Y.2001Pandemic Threat Posed by Avian Influenza A Viruses.Clinical Microbiology Reviews.14:129-149.

13.-Jackson D, Hossain J, Hickman D, Perez R D,Lamb A R. A new influenza virus virulence determinant: The NS1 protein four C-terminal residues modulate pathogenicity.2008 PNAS 105:4381-4386

14.-Jiao P, Tan G,Li Y, Deng Gang Y, Liu C, Liu W, Bu Z, Kawaoka Y, Chen H. A Single-Amino-Acid Substitution in the NS1 Protein Changes the Pathogenicity of H5N1 Avian Influenza Viruses in Mice. 2008 Journal of virology 83:1146-1154

15.-Kolaskar A S, and Tongar C P. A semi_empirical method for prediction of antigenic determinants on protein antigens FEBS 1990: 276:172174

- 16.-Krug RM, Yuan W, Noah DL, Latham AG. Intracellular warfare between human influenza viruses and human cells: The roles of the viral NS1 protein. *Virology* 2003,309:181-189
- 17.- Li.Z, Jiang.Y, Jiao. P, Wang.A, Zhao.F, Tian.G, Wong.X. 2006 The NS1 gene contributes to the virulence of H5N1 Avian Influenza Virus. *American Society for Microbiology*.
- 18.- Marschall.M Helten.A, Zach.A, Banaschewski.C, Hell.W and Ewert.M. 1999 The ORF, Regulated Synthesis, and Persistence-Specific Variation of Influenza C Viral NS1 Protein. *Virology* 253:208-218.
- 19.- Min JY, Krug RM. The primary function of RNA binding by the influenza A virus NS1 protein in infected cells: Inhibiting the 2'-oligo (A) synthetase/RNase L pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006, 103:7100-7105.
- 20.- Ozaki, H, Sugiura, T, Sugita, S, Imagawa, H, Kida, H. 2001 Detection of antibodies to the nonstructural protein (NS1) of influenza A virus allows distinction between vaccinated and infected horses. *Veterinary Microbiology* 82:111-119.
- 21.- Qiu, Y. Nemeroff, M. and Krug, M, R. 1995 The influenza virus NS1 protein binds to a specific region in human U6 snRNA and inhibits U6-U2 and U6-U4 snRNA interactions during splicing. *RNA* 1:304-316
- 22.- Salvatore.M, Baster.F.C, Parisien.P.J, Horvath.M.C, Bourmakina.S, Zheng. H, Muster. T., Palese.P, Sastre.G.A. 2002. Effects of influenza A virus NS1 protein on protein expression: the NS1 protein Enhances

Traslation and is not required for Shutoff of host Protein Synthesis. Journal of Virology.78:1206-1212.

23.-Slemons,R.D.,D,C Johnson, J.S.Osborn, and F.Hayes. 1974.Type-A influenza viruses isolated from wild free-flying ducks in California.Avian Dis-18:119-125V.

24.-Scholtissek,C.,H.Burger,O.Kistner, and K.F.Shortridge.1985.The nucleoprotein as a possible major factor in determining host specificity of influenza H3N2 viruses. Viroloy 147:287-294.

25.-Sesma F,Marukian A, Ebersole BJ, Kaminski D, Park MS. Influenza virus evades innate and adaptative immunity via the NS1 protein. J.Virol 2006.80:6295-304

26.-Stasakova J, Ferko B,Kittel C, Sereinig S, Romanova J, Katinger H,Egorov A. Influenza A mutant viruses with altered NS1 protein function provoke caspase-1 activation in primary human macrophages, resulting in fas apoptosis and release of high levels of interleukins 1 β and 18.J Gen Virol 2005, 86:185-195

27.- Suzuki,T. Takahashi,T.Guo,T,C. Hidari,J. Miyamoto,D. Goto,H. Kawaoka,Y. and Suzuki Y.2005. Sialidase Activity of Influenza A Virus in an Endocytic Pathway Enhances Viral Replication.79:18:11705-11715

28.- Twu KY, Noah DL, Rao P,kuo RL, Krug RM.The CPSF 30 binding site on the NS1 A protein of influenza A virus is a potential antiviral targe. J Virol 2006, 80:3957-3965

29.-Wang L, Suarez L D,Jackwood P M, Mibayashi M, Sastre G A, Saif M Y, Lee W Characterization of influenza virus variants with different sizes of

the non-structural (NS) genes and their potential as a live influenza vaccine in poultry 2008. *Vaccine* 26:3580-3586

30.-Wang X, Basler CF, Williams BR, Silverman RH, Palese P, Garcia-Sastre A. Functional replacement of the carboxyl-terminal two-third of the influenza A virus NS1 protein with short heterologous dimerization domains. *J Virol* 2002,76:12951-12962.

31.-Wang W, Krug M R U6atac snRNA, the highly divergent counterpart of U6snRNA, is the specific target that mediates inhibition of AT-AC splicing by the influenza virus NS1 protein 1998. *RNA* 4:55-64

32.-Zhang Q, Wang P, Kim Y, Andersen-H P, Beaver P E, Bui H-H, Bus S, Immune epitope database analysis resource (IEDB-AR)

33.-Zebedee, S.L., and R.A. Lamb. 1988. Influenza A virus M2 protein: monoclonal antibody restriction of virus growth and detection of M2 in virions. *J. Virol.* 62:2762-277

8.0.- ANEXOS

8.1.- IMAGENES

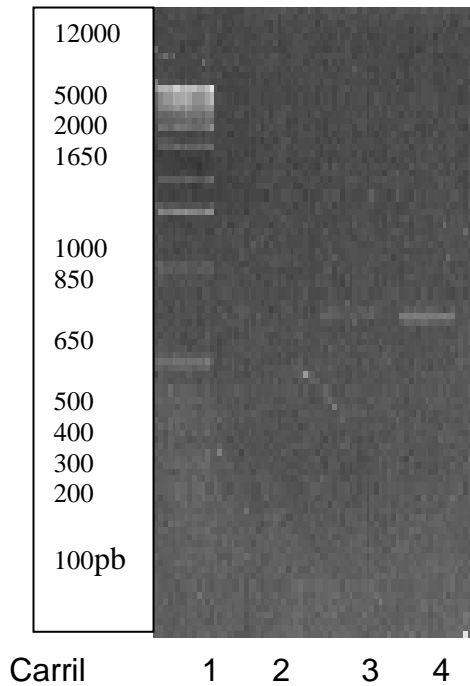


Imagen 1: Amplificación del gen NS1 correspondiente a 719 pb. Carril 1: marcador de tamaño molecular, carril 2: control negativo, carril 3 y 4 banda que corresponde a la amplificación del gen NS1.

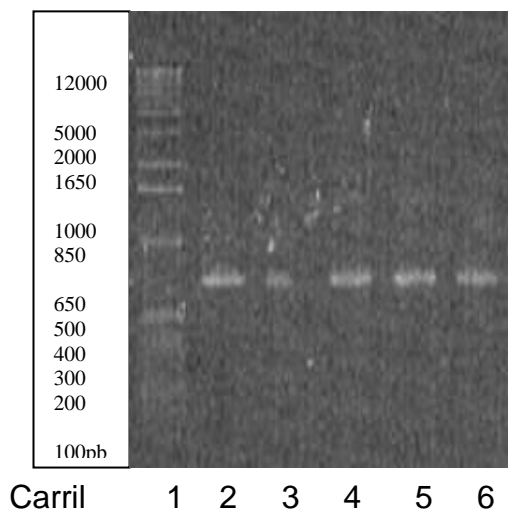


Imagen 2: Banda de 719 pb correspondiente a cepas purificadas.
Carril 1: marcador de tamaño molecular, carril 2: cepa Ahidalgo_28159_232_94
Carril 3: cepa_referencia_28159_232_94, carril 4: cepa CPA6535_05A_Querétaro
Carril 5: cepaCPA1792_06A_Coahuila carril 6: cepaCPA85_06_Querétaro

8.2 TABLAS Y DIAGRAMAS

Tabla 1: ALINEACION DE LAS SECUENCIAS DEL GEN NS1

CPA3739_05A_Coahuila	-----CVMLP---LMTDSEEEKGHS---	17
CPA6794_05A_Jalisco	-----MRDMCDAPFDDRLRRDQKALKGRSSTL	27
A_Hidal_28159_232_94	MDSNTITSFQVDCYLWHIRKLLSMRDMCDAPFDDRLRRDQKALKGRGSTL	50
CPA2579_06A_Veracruz	-----XMRDMCDAPFDDRLRRDQKALKGRGSTL	28
CPA6973_05_Durango	-----MRDMCDAPFDDRLRRDQKALKGRSSTL	27
cepa_referencia_28159_232_94	-----MRDMCDAPFDDRLRRDQKALKGRGSTL	27
CPA7637_05Hidalgo	-----RDMCDAPFDDRLRRDQKALKGRGSTL	26
CPA6535_05A_Queretaro	-----VRMRDMCDAPFDDRLRRDQKALKGRSSTL	29
CPA85_06_Queretaro	-----MRDMCDAPFDDRLRRDQKALKGRSSTL	27
CPA1792_06A_Coahuila	-----RDMCDAPFDDRLRRDQKALKGRSSTL	26
CPA2393_06A_Durango	-----LMRDMCDAPFDDRLRRDQKALKGRSSTL	28
	* * * . . : ** . .	
CPA3739_05A_Coahuila	--REEAAHLDLDS---IREWPQWKAKR-LLKTSR-----	43
CPA6794_05A_Jalisco	GLDPRVATMEGKKIVEDVLKSETNENLCPNAK-----	59
A_Hidal_28159_232_94	GLDLRAATIEGKKIVEDILKSETDEILKIAIASSPAPRYITDMSIEEISR	100
CPA2579_06A_Veracruz	GLDLRVATIEGKKIVESILKNEPDGILKIAIASIPAPRYITDMNMEEISR	78
CPA6973_05_Durango	GLDLRMATIEGKKIVEDILKNEPDEILKIAIASIPAPRYITDMSIEEISR	77
cepa_referencia_28159_232_94	GLDLRAATIEGKKIVEDILKSETDEILKIAIASSPAPRYITDMSIEEISR	77
CPA7637_05Hidalgo	GLDLRVATIEGKKIVESVLKNEPNEIPKIAIASIPAPRYITDMNMEEISR	76
CPA6535_05A_Queretaro	GLDPRVATMEGKKIVEDVLKSETNENLKIAIASSPAPRYITDMSIEEISR	79
CPA85_06_Queretaro	GLDPRVATMEGKKIVEDILKSETNENLKIAIASSPAPRYITDMSXEEISR	77
CPA1792_06A_Coahuila	GLDPRVATMEGKKIVEDVLKSETDENIKIAIASSPAPRYLPIAVHYEHR	76
CPA2393_06A_Durango	GLDLRMATIEGKKIVEDILKNEPDEILKIAIASIPAPRYITDMSIEEISR	78
	. * :: : . . .	
CPA3739_05A_Coahuila	-----VKRMKINX---XLPLGXIMDKRIILKAN-FSMLFDQQETLVS	81
CPA6794_05A_Jalisco	-----AENYRSHX---SKNGSIHHGQDLSXXXFLCXFDQLETLVS	97
A_Hidal_28159_232_94	---EWYMLMPRQKITGGLIVKMDQAIMDKRIILKAN-FSVLFDQLETLVS	146
CPA2579_06A_Veracruz	---EWYMLMPRQKITGGLIVKMDQAIMDKRIMLKAN-FSVLFDQLETLVS	124
CPA6973_05_Durango	---EWYMLMPKQKITGGLIKMDQAVMDKRIILKAN-FSVLFGQLETLVS	123
cepa_referencia_28159_232_94	---EWYMLMPRQKITGGLIVKMDQAIWTRRESYSRQTSLSYLLNNNTQGKL	124
CPA7637_05Hidalgo	---EWYMLMPRQKITGGLIVKMDQAIM-----ENNAQGKL	109
CPA6535_05A_Queretaro	---EWYMLMPKQKIIGGLIVKMDQSXMTDKRIILKANFSVLFQLETLVS	126
CPA85_06_Queretaro	---EWYMLMPKQKIIGGLIVKLDQS-IMDKRIILKANFSVLFDNWKSHG	123
CPA1792_06A_Coahuila	NKQGMVYXMPKQKIIGAKWINPSWTREYSKQISL----SYLLN-WKSHG	121
CPA2393_06A_Durango	---EWYMXMPKQKITGGLIKMDQAVMD-KRIILKANFSVLFQLETLIS	124
	. :	
CPA3739_05A_Coahuila	LRAFTEDGAIVAE-----ISPFPSMPGHSTEV-VKNAIGVLIGGL	120
CPA6794_05A_Jalisco	LRAFTVDGAIVAE-----ISPFPSMPGHSTED-VKNAIGVLIGGL	136
A_Hidal_28159_232_94	LRAFTDDGAIVAE-----ISPFPSMPGHSTED-VKNAIGILIGGL	185
CPA2579_06A_Veracruz	LRAFTDDGAIVAE-----ISPFPSMPGHSAAED-VKNAIGILIGGL	163
CPA6973_05_Durango	LRAFTDDGAIVAE-----ISPFPSMPGHSAAED-VKNAIGILIGGL	162
cepa_referencia_28159_232_94	LCPISTGFTSLTEGFHRRWRHCSNISLSFYARTFYRGCQKCNWNPHRSTT	174
CPA7637_05Hidalgo	LCIVSTGNISLTEGFHR-WRHCSNISLSFCQDILQR---MSKMQLESSSV	155
CPA6535_05A_Queretaro	LR-ATLKMAPLQK-----FLPFLLCQDILQR---MSKMQLESSSV	162
CPA85_06_Queretaro	L---SLKMAPLLK-----FLPFLLCQDILQR---MSKMQLESSSV	157
CPA1792_06A_Coahuila	L---SLKMAPLLK-----FLPFLLCQDILQR---MSKMQLESSSV	155
CPA2393_06A_Durango	LRAFTDDGAIVAE-----ISPFPSMPGHSAAED--MSKMQLESSSV	162
	* : : : . : . .	

CPA3739_05A_Coahuila	EWNDNSIRASVNIQRFAGVRD---ENGGPSLSPSRNAAWREELS-RKFE	166
CPA6794_05A_Jalisco	EWNDNSIRASENIQRFAGVRD---ENGGPSLSPKQKCCMARRVE-SKVE	182
A_Hidal_28159_232_94	EWNDNSIRASENIQRFAGVRD---ENRGPSLPPKQKRYMARRVE-SKV-	230
CPA2579_06A_Veracruz	EWNDNSIRASENIQRFVGESVM---RIGDLHSLQIRNATWREELS-QKFE	209
CPA6973_05_Durango	EWNDNSIRTSSENIQDSLGESVM---RVGDLHSFQIRNATWREELS-QNKE	208
cepa_referencia_28159_232_94	ELNSSVKYTEICLGSPEGTFTPSKAET--LHGKSVKSLKRS DGL-QSVE	221
CPA7637_05Hidalgo	DLNGMITQFER-LKTYRDSLGESVMRIGDLHSLQIRNATWREELS-QKFE	203
CPA6535_05A_Queretaro	DLNGMITQFEP-LKIYRDLLGESVMRMGDLHSPKAEMLHGKSVESLKRS	211
CPA85_06_Queretaro	DLNGMITQFER-LKIYRDLLGESVMRMGDLHSLQSEMLXGEKXVX-VRDQ	205
CPA1792_06A_Coahuila	DLNGMITQFER-LKMYRDSLGESVMRMGDLHSLQSRNAAWRQELS-RKFE	203
CPA2393_06A_Durango	DLNGMITQFER-LKTYRDSLGESVMRVGDLHSFQIRNATWREELS-QKFE	210

: * . : .

CPA3739_05A_Coahuila	EIRWLMRNVQTXN--	179
CPA6794_05A_Jalisco	EIRWLMRNVETXN--	195
A_Hidal_28159_232_94	-----	
CPA2579_06A_Veracruz	EIRWLIAECRNIW--	222
CPA6973_05_Durango	XNQ-----	211
cepa_referencia_28159_232_94	TYN-----	224
CPA7637_05Hidalgo	EIRWLIAECRNI---	215
CPA6535_05A_Queretaro	DGSCGMKT-----	219
CPA85_06_Querétaro	MANCGMKXXT-----	215
CPA1792_06A_Coahuila	EIRWLMRNVETT---	215
CPA2393_06A_Durango	EIRWLMQSVETXXXX	225

Diagrama 1: FILOGRAMA

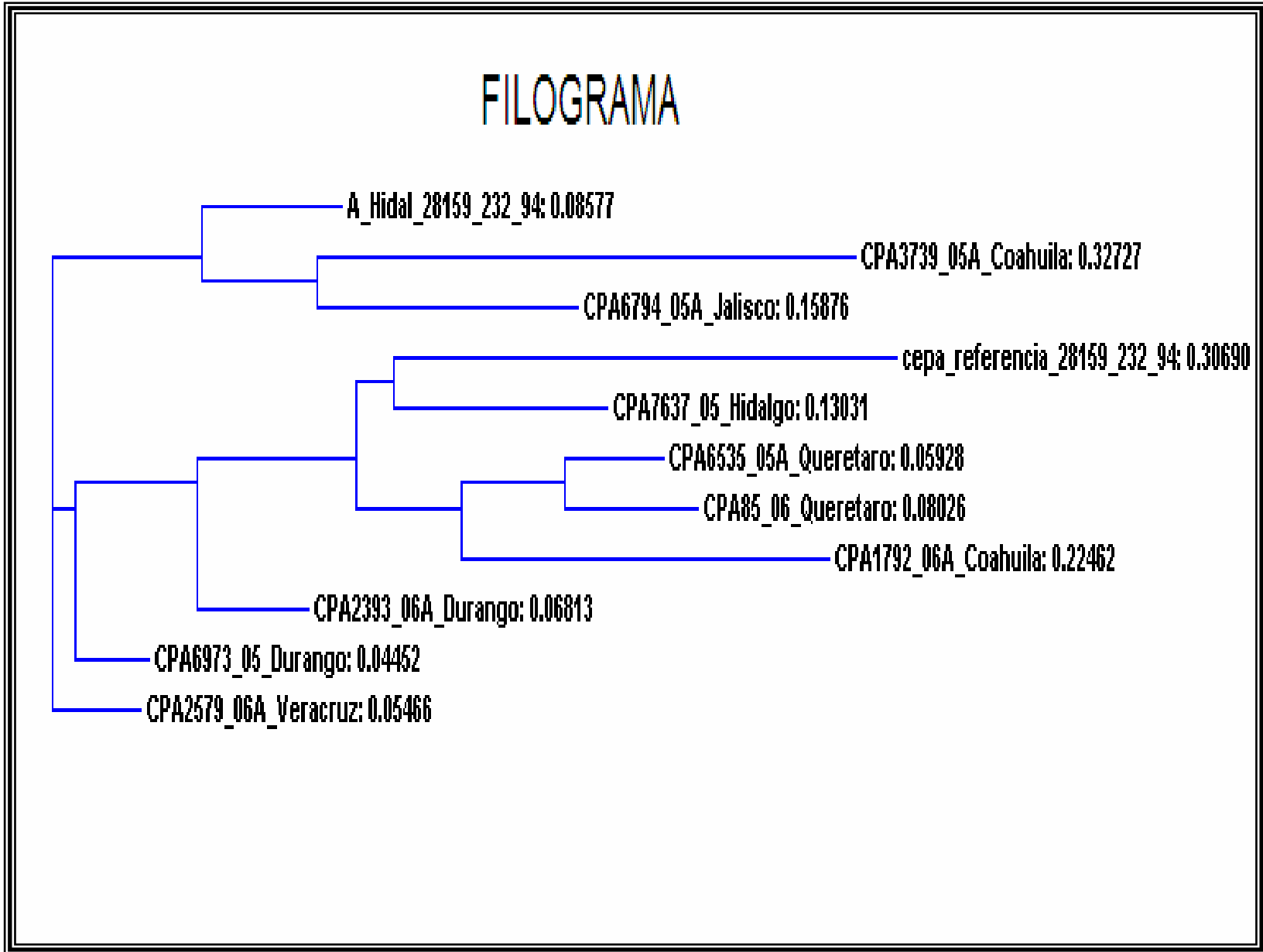


Tabla 2: Cepa A_Hidalgo_28159_232_94

Secuencia:

1 MDSNTITSFQ VDCYLWHIRK LLSMRDMCDA PFDDRLRRDQ KALKGRGSTL GLDLRAATIE
 61 GKKIVEDILK SETDEILKIA IASSPAPRYI TDMSIEEISR EWYMLMPRQK ITGGLIVKMD
 121 QAIMDKRIIL KANFSVLFQD LETLVSLRAF TDDGAIVAEI SPFPSPMGHS TEDVKNAIGI
 181 LIGGLEWNDN SIRASENIQR FAWGVRDENR GPSLPPKQKR YMARRVESKV

Determinantes antigénicas: 8

Propensidad antigénica: Promedio 1.010 Mínimo: 0.882 Máximo: 1.168

No.	Posición de inicio	Posición final	Péptido	Tamaño péptido
1	8	23	SFQVDCYLWHIRKLLS	16
2	49	57	TLGLDLRAA	9
3	76	89	ILKIAIASSPAPRY	14
4	112	120	TGGLIVKMD	9
5	127	149	RIILKANFSVLFQDLETLVSLRA	23
6	154	164	GAIVAEISPPF	11
7	175	184	KNAIGILIGG	10
8	213	218	SLPPKQ	6

Tabla 2: Cepa A_Hidalgo_28159_232_94. Muestra la secuencia de la cepa, el número de epítopes así como su posición de inicio y posición final.

Tabla 3: Cepa_referencia_28159_232_94

Secuencia:

1 MRDMCDAPFD DRLRRDQKAL KGRGSTLGLD LRAATIEGKK IVEDILKSET DEILKIAIAS
 61 SPAPRYITDM SIEEISREWY MLMPRQKITG GLIVKMDQAI WTRESYSRQT SLSYLINNNT
 121 QGKLLCPIST GFISLTEGFH RRWRHCSNIS LSFYARTFYR GCQKCNWNPV RSTTELNSSV
 181 KYTEICLGSP EGTFTPSKAE TLHGKESVKS LKRSDGLQSV ETYN

Determinantes antigénicos: 8

Propensidad antigénica: Promedio: 1.011 Mínimo: 0.865 Máximo: 1.153

No.	Posición de inicio	Posición final	Péptido	Tamaño péptido
1	26	34	TLGLDLRAA	9
2	53	66	ILKIAIASSPAPRY	14
3	89	97	TGGLIVKMD	9
4	109	115	QTLSYL	7
5	122	137	GKLLCPISTGFISLTE	16
6	146	157	CSNISLSFYART	12
7	159	165	YRGCQKC	7
8	177	189	NSSVKYTEICLGS	13

Tabla 3: Cepa_referencia_28159_232_94. Muestra la secuencia de la cepa, el número de epítopes así como su posición de inicio y posición final.

Tabla 4: Cepa: CPA6535_05A_Querétaro

Secuencia:

1 VRMRDMCDAP FDDLRLRRDQR ALKGRSSTLG LDPRVATMEG KKIVEDVLKS ETNENLKIAI
 61 ASSPAPRYIT DMSIEEISRE WYMLMPKQKI IGGLIVKMDQ SMDKRIILKA NFSVLFQLE
 121 TLVSLRATLK MAPLQKFLPF LLCQDILQRM SKMQLESSSV DLNGMITQFE PLKIYRDLG
 181 ESVMRMGDLH SPKAEMLHGE KSVESLKRSD GSCGMKT

Determinantes antigénicas: 7

Propensidad antigénica: Promedio: 1.017 Mínimo: 0.872 Máximo: 1.201

No.	Posición de inicio	Posición final	Péptido	Tamaño péptido
1	28	34	TLGLDPR	7
2	44	50	VEDVLKS	7
3	57	68	KIAIASSPAPRY	12
4	91	98	IGGLIVKM	8
5	105	128	RIILKANFSVLFQLETLVSLRAT	24
6	130	146	KMAPLQKFLPFLLCQDI	17
7	169	178	FEPLKIYRDL	10

Tabla 4: Cepa: CPA6535_05A_Querétaro. Muestra la secuencia de la cepa, el número de epítopes así como su posición de inicio y posición final.

Tabla 5: Cepa CPA1792_06A_Coahuila

Secuencia:

1 RDMCDAPFDD RLRRDQ^RRALK GRSSTLGLDP RVATMEGKKI VEDVLKSETD ENIKIAIASS
 61 PAPRYLPIAV HYEHR^RRNKQG MVYMPKQKII GAKWINPSWT REYSKQISLS YLINWKHSHG
 121 LSLKMAPLLK FLPFLLCQDI LQRMSKMQLE SSSVDLNGMI TQFERLKMYR DSLGESVMRM
 181 GDLHSLQSRN AAWRQELSRK FEEIRWLMRN VETT

Determinantes antihigiénicos: 7

Propensidad antigénica: Promedio: 1.013 Mínimo: 0.881 Máximo: 1.201

No.	Posición de inicio	Posición final	Péptido	Tamaño péptido
1	25	31	TLGLDPR	7
2	41	47	VEDVLKS	7
3	54	73	KIAIASSPAPRYLPIAVHYE	20
4	81	90	MVYMPKQKII	10
5	105	115	KQISLSYLINW	11
6	118	140	SHGLSLKMAPLLKFLPFLLCQDI	23
7	183	189	LHSLQSR	7

Tabla 5: Cepa CPA1792_06A_Coahuila la secuencia de la cepa, el numero de epítopes así como su posición de inicio y posición final.

Tabla 6: Cepa CPA85_06_Querétaro

Secuencia:

1 MRDMCDAPFD DRLRRDQRAL KGRSSTLGLD PRVATMEGKK IVEDILKSET NENLKIAIAS
 61 SPAPRYITDM SEEISREWYM LMPKQKIIGG LIVKLDQSIM DKRIILKANF SVLFDNWKHS
 121 HGLSLKMAPL LKFLPFLLCQ DILQRM SKMQ LESSVDLNG MITQFERLKI YRDLLGESVM
 181 RMGDLHSLQS EMLGEKVVRD QMANCGMKT

Determinantes antigénicos: 7

Propensidad antigenica: Promedio: 1.016 Mínimo: 0.872 Máximo: 1.201

No.	Posición de inicio	Posición final	Péptido	Tamaño péptido
1	26	32	TLGLDPR	7
2	55	66	KIAIASSPAPRY	12
3	88	97	IGGLIVKLDQ	10
4	103	115	RIILKANFSVLFD	13
5	120	142	SHGLSLKMAPLLKFLPFLLCQDI	23
6	167	174	RLKIYRDL	8
7	185	191	LHSLQSE	7
8	195	200	EKVVRD	6

Tabla 6: Cepa CPA85_06_Querétaro. Muestra la secuencia de la cepa, el número de epítopes así como su posición de inicio y posición final.

Tabla 7: Cepa CPA6973_05_Durango

Secuencia:

1 MRDMCDAPFD DLRRLDQKAL KGRSSTLGLD LRMATIEGKK IVEDILKNP DEILKIAIAS
 61 IPAPRYITDM SIEEISREWY MLMPKQKITG GLIHKMDQAV MDKRIILKAN FSVLFGQLET
 121 LVSLRAFTDD GAIVAEISPF PSMPGHS AED VKNAIGILIG GLEWWDNSIR TSENIQDSL
 181 ESVMRVGDLH SFQIRNATWR EELSQNKENQ

Determinantes antigenicos: 7

Propensidad antigénica: Promedio: 1.007 Mínimo: 0.888 Máximo: 1.132

No.	Posición de inicio	Posición final	Péptido	Tamaño péptido
1	26	32	TLGLDLR	7
2	53	66	ILKIAIASIPAPRY	14
3	89	97	TGGLIHKMD	9
4	102	126	DKRIILKANFSVLFGQLETLVSLRA	25
5	131	141	GAIVAEISPF	11
6	152	161	KNAIGILIG	10
7	180	193	GESVMRVGDLHSFQ	14

Tabla 7: Cepa CPA6973_05_Durango. Muestra la secuencia de la cepa, el número de epítopes así como su posición de inicio y posición final.

Tabla 8: Cepa CPA2393_06A_Durango

Secuencia:

1 LMRDMCDAPF DDRLRRDQKA LKGRSSTLGL DLRMATIEGK KIVEDILKNE PDEILKIAIA
 61 SIPAPRYITD MSIEEISREW YMPKQKITG GLIKMDQAV MDKRIILKAN FSVLFGQLET
 121 LISLRAFTDD GAIVAEISPF PSMPGHSAED MSKMQLSSS VDLNGMITQF ERLKTYRDSL
 181 GESVMRVGDL HSFQIRNATW REELSQKFEE IRWLMQSVET

Determinantes antigenicos: 6

Propensidad antigenica: Promedio: 1.005 Minimo: 0.888 Maximo: 1.125

No.	Posición de inicio	Posición final	Péptido	Tamaño péptido
1	27	33	TLGLDLR	7
2	54	67	ILKIAIASIPAPRY	14
3	89	97	TGGLIKMD	9
4	102	126	DKRIILKANFSVLFGQLETLISLRA	25
5	131	141	GAIVAEISPPF	11
6	181	194	GESVMRVGDLHSFQ	14

Tabla 8: Cepa CPA2393_06A_Durango. Muestra la secuencia de la cepa, el numero de epítopes así como su posición de inicio y posición final.

Tabla 9: Cepa CPA2579_06A_Veracruz

Secuencia:

1 MRDMCDAPFD DRLRRDQKAL KGRGSTLGLD LRVATIEGKK IVESILKNEP DGILKIAIAS
 61 IPAPRYITDM NMEEISREWY MLMPRQKITG GLIVKMDQAI MDKRIMLKAN FSVLFDQLET
 121 LVSLRAFTDD GAIVAEISPF PSMPGHS AED VKNAIGILIG GLEWNDNSIR ASENIQRFVG
 181 ESVMRIGDLH SLQIRNATWR EELSQKFEEI RWLIAECRNI W

Determinantes antigénicos: 8

Propensidad antigénica: Promedio: 1.008 Mínimo: 0.844 Máximo: 1.132

No.	Posición de inicio	Posición final	Péptido	Tamaño péptido
1	26	36	TLGLDLRVATI	11
2	53	66	ILKIAIASIPAPRY	14
3	89	97	TGGLIVKMD	9
4	110	126	NFSVLFDQLETLVSLRA	17
5	131	141	GAIVAEISPPF	11
6	152	161	KNAIGILIGG	10
7	176	182	QRFVGES	7
8	188	195	DLHSLQIR	8

Tabla 9: Cepa CPA2579_06A_Veracruz. Muestra la secuencia de la cepa, el número de epítopes así como su posición de inicio y posición final.

Tabla 10: Cepa CPA7637_05_Hidalgo

Secuencia:

1 RDMCDAPFDD RLRRDQKALK GRGSTLGLDL RVATIEGKKI VESVLKNEPN EIPKIAIASI
 61 PAPRYITDMN MEEISREWYM LMPRQKITGG LIVKMDQAIM EENNAQGKLL CIVSTGNISL
 121 TEGFHRWRHC SNISLSFCQD ILQRMSKMQ L ESSVDLNGM ITQFERLKTY RDSLGESVMR
 181 IGDHLSQLIR NATWREELSQ KFEEIRWLIA ECRNI

Determinantes antigénicos: 7

Propensidad antigénica: Promedio: 1.007 Mínimo: 0.844 Máximo: 1.198

No.	Posición de inicio	Posición final	Péptido	Tamaño de péptido
1	25	35	TLGLDLRVATI	11
2	40	47	IVESVLKN	8
3	54	65	KIAIASIPAPRY	12
4	88	96	TGGLIVKMD	9
5	107	116	GKLLCIVSTG	10
6	130	141	CSNISLSFCQDI	12
7	183	190	DLHSLQIR	8

Tabla 10: Cepa CPA7637_05_Hidalgo. Muestra la secuencia de la cepa, el número de epítopes así como su posición de inicio y posición final.

Tabla 11: Valores Kolaskar y Tongaonkar de los Aminoácidos

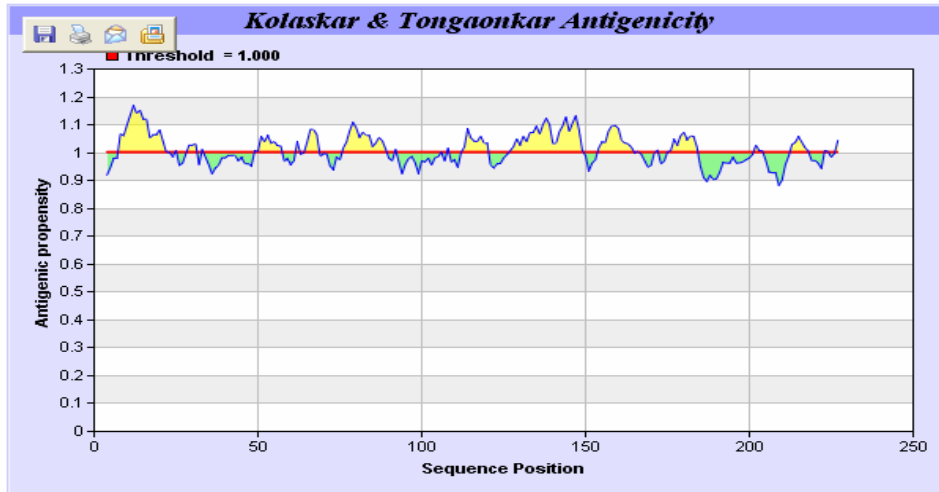
AMINOACIDO	SIMBOLO	VALOR
Serina	S	1.012
Prolina	P	1.064
Alanina	A	1.064
Histidina	H	1.105
Fenilalanina	F	1.091
Glutamina	Q	1.015
Leucina	L	1.25
Isoleucina	I	1.152
Cisteina	C	1.412
Valina	V	1.383
Tirosina	Y	1.161
Acido aspartico	D	0.866
Acido glutámico	E	0.851
Glicina	G	0.874
Licina	K	0.93
Metionina	M	0.826
Asparagina	N	0.776
Arginina	R	0.873
Treonina	T	0.909
Triptofano	W	0.893

PEPTIDO EN COMUN	NOMBRE DE LA CEPA								
	Ahidalgó _28159_232_94	referencia_ 28159_232_94	CPA6535_ 05A_Querétaro	CPA1792_ 06A_Coahuila	CPA85_ 06_Querétaro	CPA6973_ 05_Durango	CPA2393_ 06A_Durango	CPA2579_ 06A_Veracruz	CPA7637_ 05_Hidalgo
1 SFQVDCYLWHIRKLLS	SI	X							
2 TLGLDLRAA	SI	SI	SI	SI	SI	SI	SI	SI	SI
3 ILKIAIASSPAPRY	SI	SI	SI	SI	SI	SI	SI	SI	SI
4 TGGLIVKMD	SI	SI	SI	X	SI	X	X	SI	X
5 RIILKANFSVLFDQLETLVSLRA	SI	X	SI	X	SI	X	X	X	X
6 GAIVAEISPPF	SI	X	X	X	X	SI	SI	SI	X
7 KNAIGILIGG	SI	X	X	X	X	SI	X	SI	X
8 SLPPKQ	SI	X	X	X	X	X	X	X	X
9 QTSLSYL	X	SI	X	X	X	X	X	X	X
10 GKLLCPISTGFISLTE	X	SI	X	X	X	X	X	X	X
11 CSNISLSFYART	X	SI	X	X	X	X	X	X	X
12 YRGCQKC	X	SI	X	X	X	X	X	X	X
13 VEDVLKS	X	X	SI	X	X	X	X	X	X
14 KMAPLQKFLPFLLCQDI	X	X	SI	X	X	X	X	X	X
15 FEPLKIYRDL	X	X	SI	X	X	X	X	X	X
16 MVYMPKQKII	X	X	X	SI	X	X	X	X	X
17 KQISLSYLINW	X	X	X	SI	X	X	X	X	X
18	X	X	X	SI	SI	X	X	X	X
SHGLSLKMAPLLKFLPFLLCQD									
19 LHSLQSR	X	X	X	SI	X	X	X	X	X
20 RLKIYRDL	X	X	X	X	SI	X	X	X	X
21 EKVVRD	X	X	X	X	SI	X	X	X	X
22 TGGLIIMD	X	X	X	X	X	SI	SI	X	SI
23	X	X	X	X	X	SI	SI	X	X
DKRIILKANFSVLFGQLETLVSLRA									
24 GESVMRVDLHLSFQ	X	X	X	X	X	SI	SI	X	X
25 NFSVLFDQLETLVSLRA	X	X	X	X	X	X	X	SI	X
26 QRFVGS	X	X	X	X	X	X	X	SI	X
27 DLHSLQIR	X	X	X	X	X	X	X	SI	SI
28 IVESVLKN	X	X	X	X	X	X	X	X	SI
29 GKLLCIVSTG	X	X	X	X	X	X	X	X	SI
30 CSNISLSFCQDI	X	X	X	X	X	X	X	X	SI

TABLA 12: Epítotos que se encuentran en las secuencias de las diferentes cepas. El epítoto numero dos se encuentra presente en todas las cepas, el epítoto tres también se encuentra en todas las cepas con algunos aa de más ya sea al principio o al final de su secuencia pero siempre conservando la secuencia KIAIASSPAPRY.

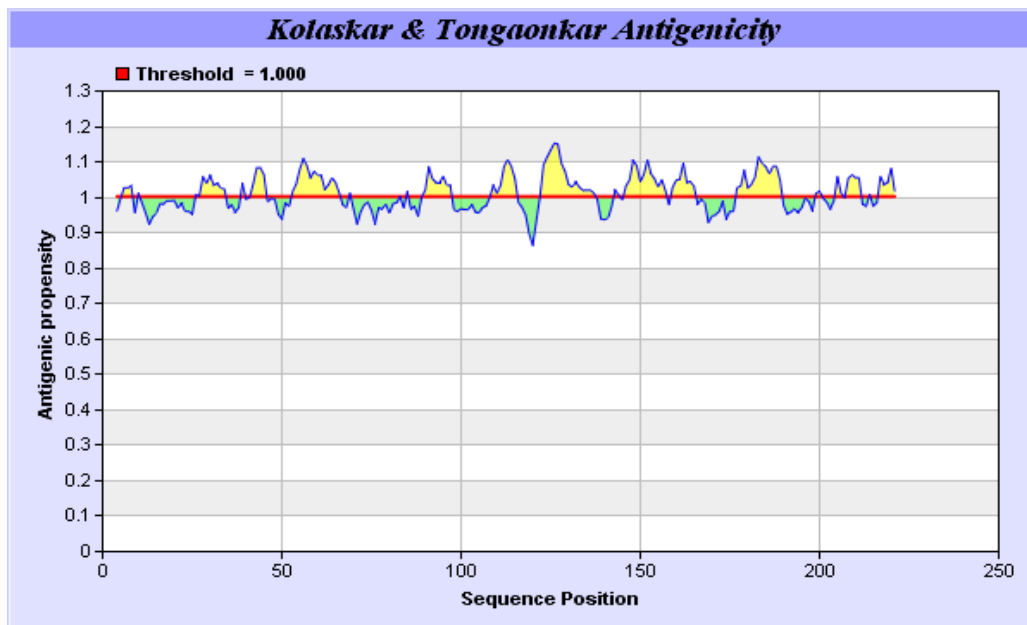
8.3.- GRAFICAS

Gráfica 1: Cepa AHidalgo_28159_232_94



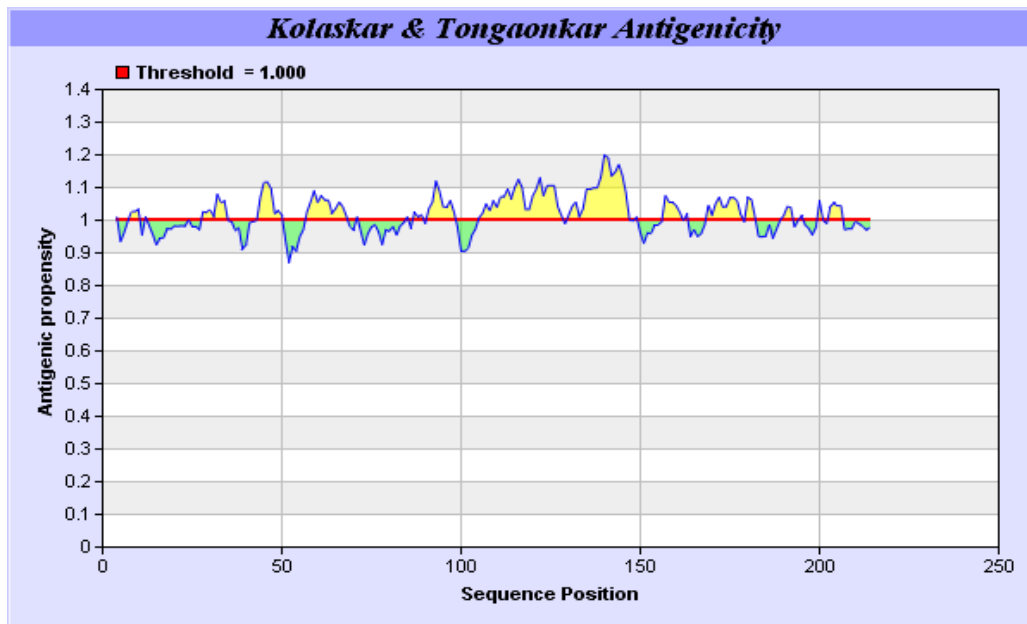
Gráfica 1: Cepa AHidalgo_28159_232_94.Muestra la propensidad antigénica de las secuencia de la proteína NS1.

Gráfica 2: cepa_referencia_28159_232_94



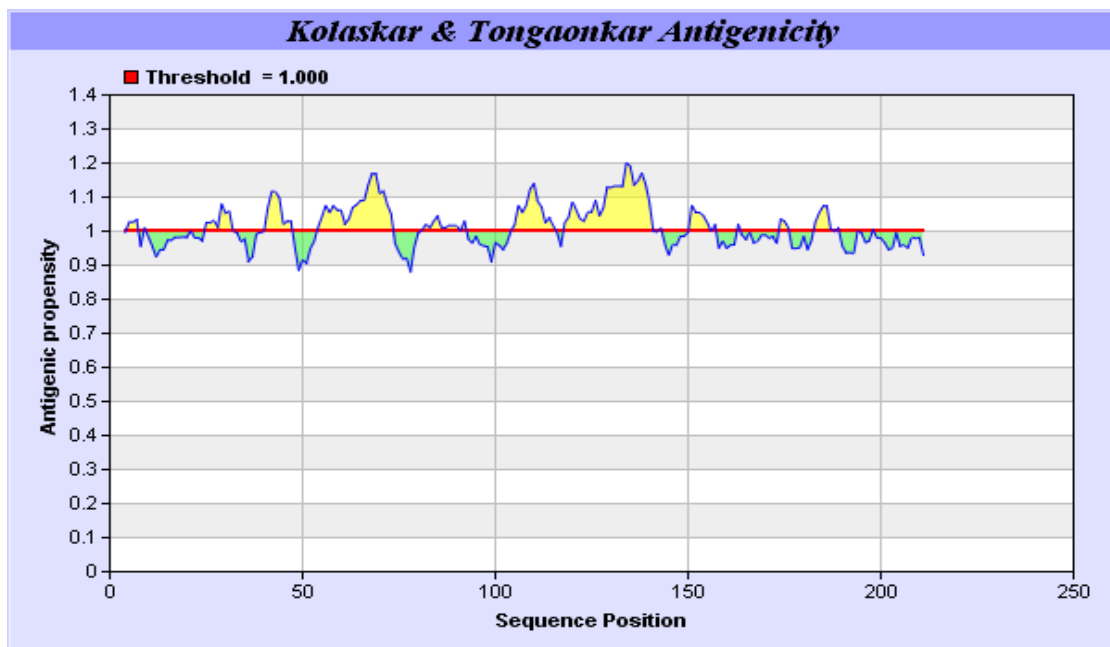
Gráfica 2: cepa_referencia_28159_232_94.Muestra la propensidad antigénica de las secuencia de la proteína NS1

Grafica 3: Cepa: CPA6535_05A_Querétaro



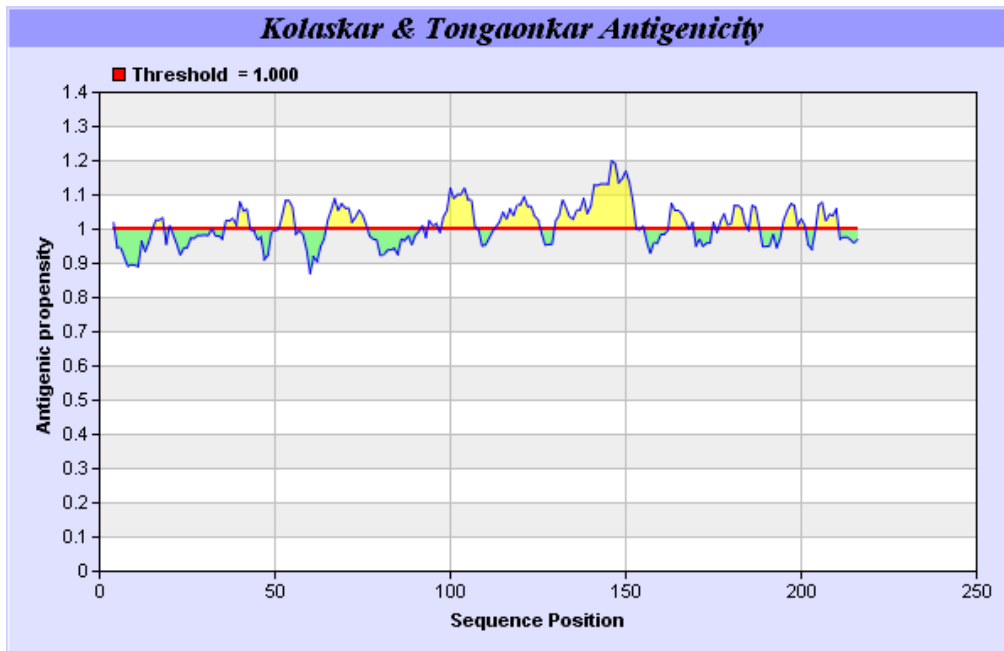
Grafica 3: Cepa: CPA6535_05A_Querétaro. Muestra la propensidad antigénica de las secuencia de la proteína NS1.

Grafica 4: Cepa CPA1792_06A_Coahuila



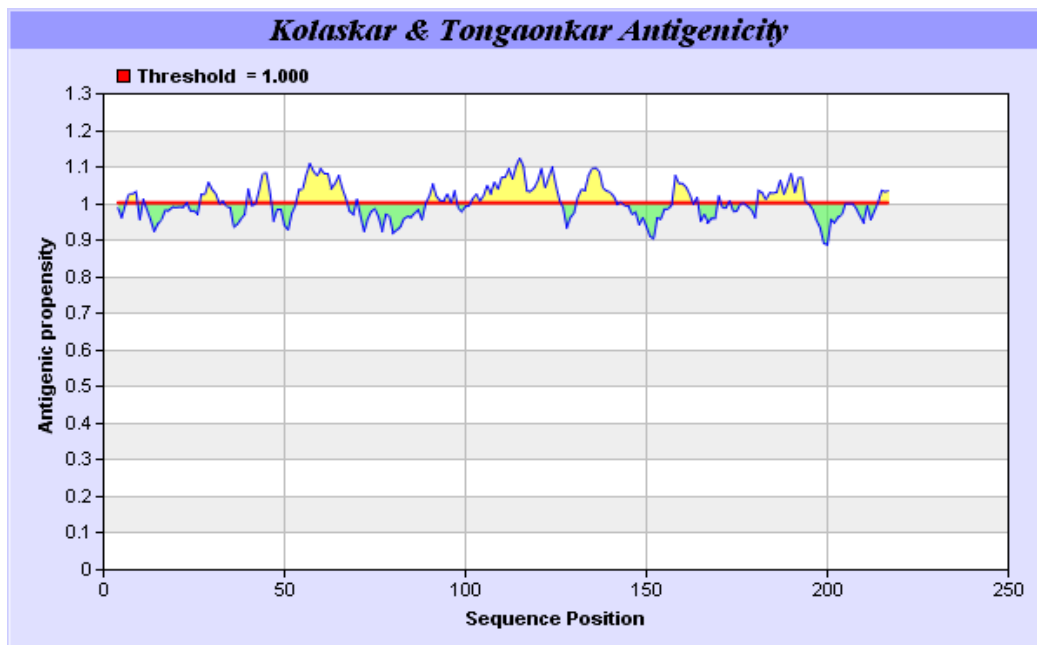
Grafica 4: Cepa CPA1792_06A_Coahuila. Muestra la propensidad antigénica de las secuencia de la proteína NS1.

Grafica 5:Cepa CPA85_06_Querétaro



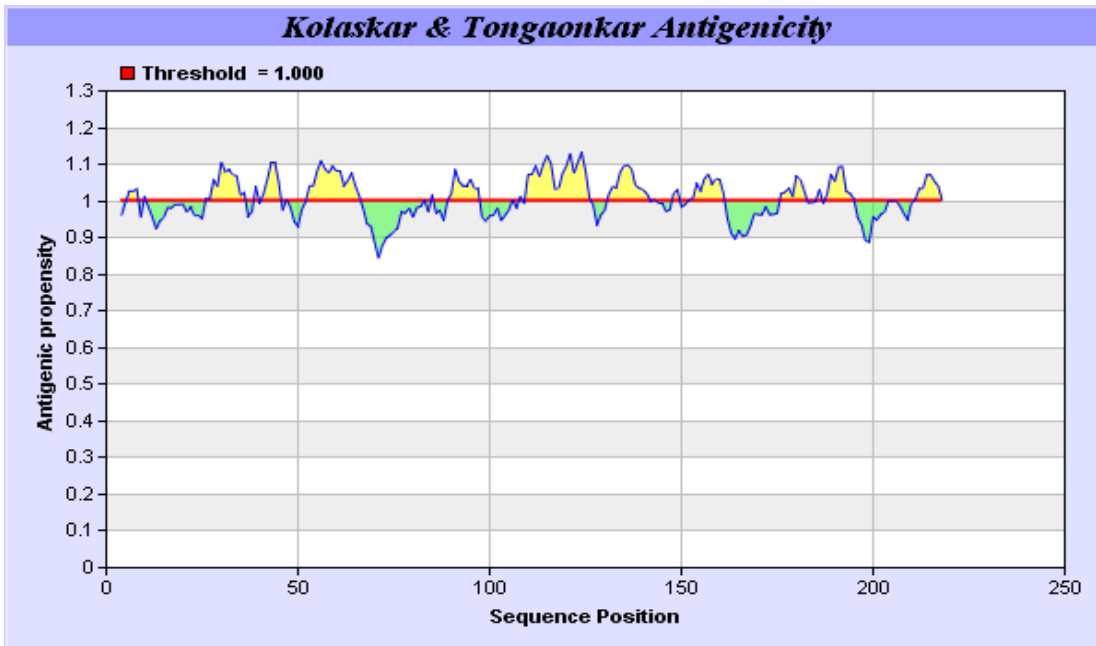
Grafica 5:Cepa CPA85_06_Querétaro. Muestra la propensidad antigénica de las secuencia de la proteína NS1.

Grafica 6: Cepa CPA2393_06A_Durango



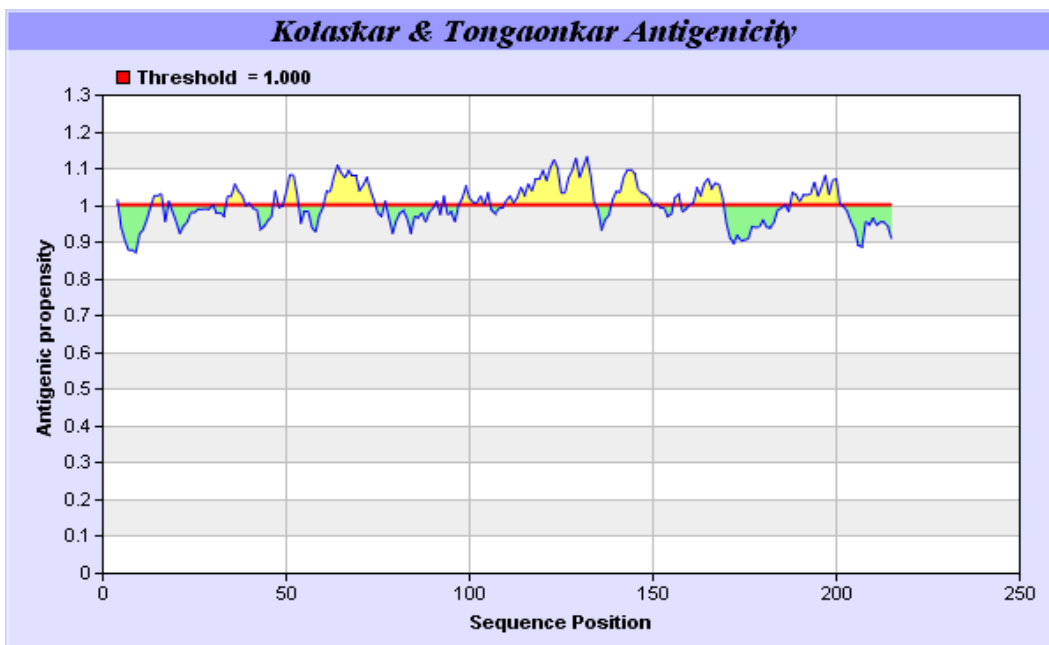
Grafica 6: Cepa CPA2393_06A_Durango. Muestra la propensidad antigénica de las secuencia de la proteína NS1.

Grafica 7: Ceba CPA2579_06A_Veracruz



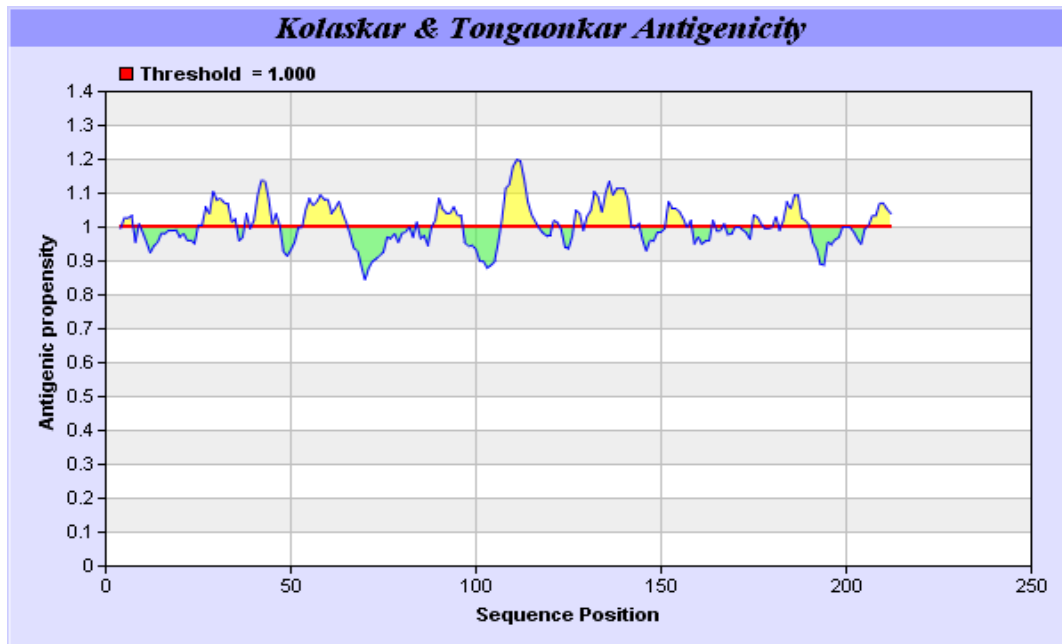
Grafica 7: Ceba CPA2579_06A_Veracruz. Muestra la propensidad antigénica de las secuencia de la proteína NS1.

Grafica 8: Ceba CPA6973_05_Durango



Grafica 8: Ceba CPA6973_05_Durango. Muestra la propensidad antigénica de las secuencia de la proteína NS1.

Grafica 9: Cepa CPA7637_05_Hidalgo



Grafica 9: Cepa CPA7637_05_Hidalgo. Muestra la propensidad antigénica de las secuencia de la proteína NS1.