



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES DE CUAUTITLÁN

**ESTANDARIZACIÓN DE UN MÉTODO PARA
DETECTAR LA MUTACIÓN S31N EN LA MATRIZ 2
DEL VIRUS DE LA INFLUENZA A H1N1 PANDÉMICA
QUE CONFIERE RESISTENCIA A LOS
ADAMANTANOS.**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO
PRESENTA:**

JESÚS ZAVALA DÍAZ DE LEÓN

ASESORES:

**DR. JOSÉ ERNESTO RAMÍREZ GONZÁLEZ
M. EN C. ANA LAURA VÁZQUEZ MARTÍNEZ**

CUAUTITLÁN IZCALLI, EDO. DE MEX.

2011



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

A lo largo de la vida hay sueños, metas y propósitos que uno quiere llegar a cumplir. Esfuerzos como lo es obtener un título profesional es una alegría que se vive pocas veces.

Agradezco y dedico este trabajo:

Quiero empezar agradeciendo a quien hizo todo esto posible, mi mejor amigo, mi fiel compañero, doy gracias a Dios por haberme permitido vivir esta gran satisfacción, por darme fortaleza, por toda la experiencia adquirida, por no dejarme caer y por darme todo lo que tengo.

A mis padres, por darme la vida, por su amor, dedicación, motivación y su ejemplo, sin ustedes esto no sería una realidad, gracias por estar siempre conmigo.

Al Dr. Ernesto por todo su apoyo, experiencia, tiempo y asesoría en la realización de este proyecto.

A la M. en C. Ana Laura por asesorarme en la redacción del proyecto.

A los profesores que integraron el jurado: Dra. Gilda, M. en C. Ana Laura, MVZ. Gerardo, Dra. Sandra, Dra. Susana, gracias por todo.

A Paty: Por tus valiosos consejos y tu excelente amistad.

A Ely, Ara, Aida, Abril, Lidia, Claudia, Susy, Juan Carlos y todo el laboratorio de Genoma de Patógenos del InDRE, por su valiosa amistad, confianza y amabilidad.

A Faby, Brisia, Clara, Miguel, Hugo: Gracias por su amistad.

A mis amigos y compañeros de la universidad, por su amistad, por su compañía e inolvidables momentos: Monse, Susana, Caleb, Tania, Héctor, Oscar, Vero, Naye, Ana, Karla, Sandy, Mandy, Octavio, Ludwig, Letzy, Diego y todas las personas que siempre han estado conmigo.

Al Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológica por darme la oportunidad y los recursos para la realización de este proyecto.

A la Universidad Nacional Autónoma de México por haberme formado como profesionalista, le estaré agradecido por siempre.

El trabajo de tesis que a continuación se presenta fue realizado en su totalidad dentro de las instalaciones del Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológica de la Secretaría de Salud bajo la dirección del Dr. José Ernesto Ramírez González, Jefe del Laboratorio de Genoma de Patógenos.

Índice:

Página

Índice de figuras	i
Índice de tablas	ii
Índice de gráficos	iii
Abreviaturas	iv
Resumen	v
Capítulo I	
Marco teórico	1
1.1 Antecedentes históricos	3
1.2 Clasificación	7
1.3 Patogenia	10
1.4 Características del virus de la influenza	14
1.4.1 Morfología	14
1.4.2 Organización genómica	15
1.4.3 Variación genética	15
1.4.4 Proteínas virales	17
1.4.4.1 Proteína M2	19
1.4.5 Antivirales.	21
1.4.5.1 Adamantanos	22
1.5 Pandemias provocadas por el virus de la influenza	23
1.5.1 La pandemia del 2009	24
1.6 Mutación S31N	28

Capítulo II	Página
2.1 Justificación	29
2.2 Objetivos	30
Capítulo III	
Estrategia experimental	31
3.1 Material	34
3.1.1 Equipo	34
3.1.2 Accesorios	34
3.1.3 Reactivos	34
3.1.4 Muestras biológicas	34
3.2 Métodos.	35
3.2.1 Selección de iniciadores	35
3.2.2 Método para extracción de RNA viral	35
3.2.3 Método para RT-PCR	36
3.2.4 Método para cuantificación	37
3.2.5 Método para secuencia y análisis de datos moleculares	38
Capítulo IV	
Resultados y discusión	42
Capítulo V	
Conclusiones	51
Referencias	54

Índice de figuras

	Página
Figura 1. Infecciones con influenza de origen aviar en los últimos años.	2
Figura 2. Imagen de microscopia electrónica del virus de la influenza A H1N1, con 80-120 nm de diámetro.	7
Figura 3. Subtipos del virus de la influenza que afectan a humanos.	8
Figura 4. Patogenia del virus de la influenza.	11
Figura 5. Replicación del virus de la influenza.	12
Figura 6. Esquema de una partícula del virus de la influenza.	14
Figura 7. Variabilidad del virus de la influenza.	17
Figura 8. Ilustración de los 8 genes que conforman el genoma viral de la influenza A pandémica, así como la especie donde se originan.	19
Figura 9. Diferentes proteínas que conforman el virus, se observa la proteína M2 como un canal transmembranal.	20
Figura 10. Mapa de iniciadores.	44
Figura 11. Imagen digital donde se muestran productos de PCR con un tamaño de 230 pb, correspondientes al gen de la matriz 3 del virus de la influenza A H1N1 pandémica.	45
Figura 12. Electroferograma visualizado en el programa Chromas, el cual muestra el fragmento de secuencia obtenida usando los iniciadores F650 y R900.	46
Figura 13. Electroferogramas visualizados en el programa Chromas. a) Secuencia donde no está presente la mutación S31N, b) Secuencia con el cambio de bases que provoca la mutación S31N.	47
Figura 14. Alineamiento múltiple donde se observan las diferencias entre influenza A H1N1 pandémica y H1N1 estacional.	48
Figura 15. Traducción de los nucleótidos en aminoácidos y marcadores de resistencia.	49
Figura 16. Alineamiento múltiple traducido en aminoácidos, donde se observa el cambio E16G y S31N.	50
Figura 17. Alineamiento de secuencias que presentan cambios en la proteína.	51

Índice de tablas

	Página
Tabla 1. Casos y defunciones a causa de influenza A H1N1 pandémica, OMS.	27
Tabla 2. Protocolo de mezcla "Master mix" para RT-PCR de Influenza A H1N1.	35
Tabla 3. Cantidad de DNA requerida según el número de bases en el fragmento.	38
Tabla 4. Muestras donde se observaron mutaciones expresadas en la proteína M2.	51

Índice de gráficos

	Página
Gráfico 1. Datos oficiales publicados por la OMS con confirmación serológica, hasta el 18 de octubre del 2009, OMS.	26
Gráfico 2. Distribución de los casos confirmados de acuerdo a la fecha de inicio de síntomas, InDRE.	27
Grafico 3. Flujograma de trabajo	32

Abreviaturas

aa: Aminoácido

BLAST: Basic Local Aligment Search Tool

cDNA: DNA complementario

ddNTPS: Didesoxinucleotidos

HA: Hemaglutinina

IFN: Interferón

InDRE: Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológica

M: Proteína matriz

M2: Proteína matriz 2

NA: Neuraminidasa

NCBI: Nacional Center for Biotechnology Information

NP: Nucleoproteína

NS: No estructural

nt: Nucleotidos

OMS: Organización Mundial de la Salud

pb: Pares de bases

PB: Polimerasa

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

RNP: Ribonucleoproteína

SNC: Sistema Nervioso Central

Resumen

El trabajo de investigación que propuso esta tesis es hacer ensayos utilizando extractos de RNA viral de Influenza A H1N1 pandémica obtenido de diversas fuentes como: Cultivo celular y muestras biológicas de biopsia, exudados, sueros, estos RNA virales fueron extraídos por medio de una técnica basada en el lavado con buffers y precipitación con etanol, para después amplificarlos mediante una técnica de RT-PCR optimizada y finalmente obtener la secuencia de estos amplicones para su análisis.

Se realizaron diversas pruebas de RT-PCR, modificando temperaturas y tiempos hasta lograr optimizar las condiciones de trabajo para tener rendimientos de concentración del amplicon de DNA favorables para su posterior secuenciación.

Se cuantificaron los productos de PCR con DNAchips, siguiendo el fundamento del desplazamiento del material genético por presión o por fuerzas electromagnéticas a volúmenes de picolitro y más tarde purificar por medio de la enzima ExoSapIt y Exonucleasa I.

La electroforesis capilar automatizada permitió obtener la secuencia de DNA para su posterior análisis usando herramientas bioinformáticas como: Sequencing Analysis, Chromas, BLAST de NCBI, Clustal X y BioEdit, con esto se obtuvo un análisis detallado de datos moleculares y fue posible establecer un protocolo optimizado para la detección de la mutación S31N del gen M2 que confiere resistencia del virus a los antivirales adamantanos.

Capítulo I

Marco teórico

Cuando se habla de influenza no es necesario citar a instituciones de salud pública ni gubernamentales para darse cuenta del alcance e importancia que tiene este virus entre los seres humanos, el foco de alerta cambia de intensidad cuando informa que la influenza es altamente transmisible ya no es imperativo que alguien estornude cerca de donde nos encontramos, basta simplemente saludar de beso o estrechar la mano y ya es posible un contagio. El pánico empieza a surgir cuando aparte de que tenemos que sobrepasar el riesgo de un contacto directo, también existen formas indirectas de adquirir el virus ya que este puede permanecer activo durante 48 horas después de el contacto con superficies inertes si no es eliminado con agentes como: luz UV, jabón, alcohol o cierto tipo de gel; Otros factores de importancia son:

- Los niños son los principales transmisores en comparación con los adultos, ya que expulsan el virus más rápido aproximadamente en los primeros 3 días, antes de que los síntomas se noten y durante más tiempo (Santos-Burgoa, 2009).
- El riesgo aumenta en mujeres embarazadas, personas con exceso de peso, inmunodeprimidos, como es el caso de pacientes con cáncer y VIH, personas con enfermedades crónicas cardiorespiratorias y diabetes mellitus y en personas con hepatitis crónica de tipo B o C (Santos-Burgoa, 2009).

En la figura 1 se muestra la problemática del virus de la influenza de origen aviar en los últimos años, este representa un riesgo de salud latente, ya que requiere un monitoreo y medidas de prevención constantes (<http://1.bp.blogspot.com/.../s1600/influenza, 2009>).

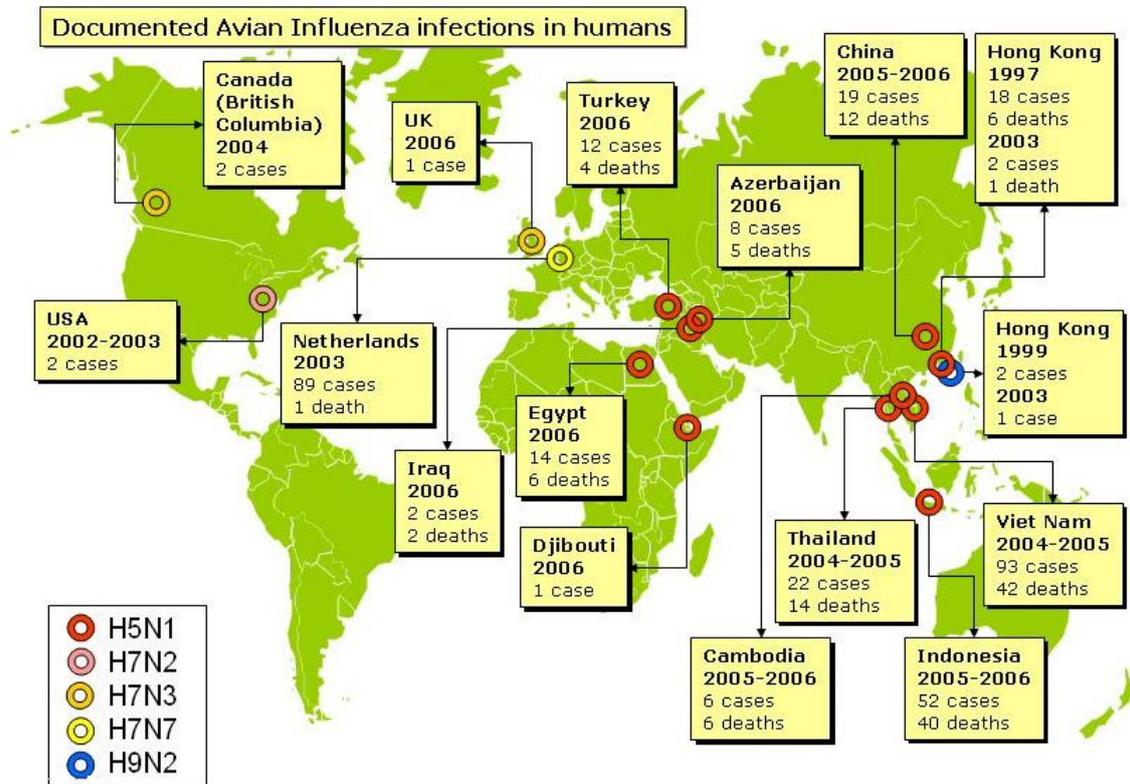


Figura 1: Infecciones con influenza de origen aviar en los últimos años (<http://1.bp.blogspot.com/.../s1600/influenza, 2009>).

La razón del gran interés que hay sobre la influenza no acaba aquí, hay otro factor el cual reside en el material genético del virus, y es que muta produciendo modificaciones en el comportamiento del patógeno confiriéndole más virulencia y en ocasiones la facultad de resistir a los principales antivirales como lo son el oseltamivir y amantadina.

Por esta misma razón surge necesidad del desarrollo y optimización de técnicas moleculares que permitan conocer el comportamiento de estas nuevas cepas y al mismo tiempo ofrecer un diagnóstico a nivel molecular que por las características del RNA viral pudo ser por medio de RT-PCR y secuencia del ácido nucléico.

1.1 Antecedentes históricos

La influenza es una enfermedad respiratoria aguda severa que ha afectado a los seres humanos desde la antigüedad. La inesperada aparición de enfermedades respiratorias que persisten por pocas semanas y de igual forma desaparece, son características suficientes para identificar un número de epidemias mayores en el pasado. Una de estas epidemias fue reportada por Hipócrates, el padre de la medicina en el año 412 a.C. Numerosos episodios similares también fueron descritos en la edad media (Ayora-Talavera, 1999).

El término influenza fue introducido en Italia al inicio del siglo XV para describir una epidemia que fue atribuida a la influencia de las estrellas. El término fue adoptado por los ingleses en el siglo XVIII; durante el mismo período los franceses denominaron la enfermedad como la "grippe".

Una descripción precisa de las principales características de la influenza se describe en una carta enviada desde Edimburgo por Lord Randolph a Lord Cecil en Noviembre de 1562 donde cita:

"Inmediatamente que la Reina llegó aquí, ella cayó con una nueva enfermedad que es común en este pueblo, llamado aquí la acquayntance, la cual pasó a toda su corte, ya sean estos lords, ladies o damiselas o ya sean ingleses o franceses. Es una plaga en sus cabezas, y dolor en sus estómagos, con una gran tos, que en algunos permanece por más tiempo que en otros, mientras encuentra cuerpos aptos para desarrollarse. La Reina estuvo en cama por seis días. No hubo peligro, no muchos murieron por la enfermedad, excepto algunos amigos ancianos. Mi Lord de Murraye está enfermo ahora, el Lord de Lidlington la ha tenido y yo estoy asombrado de decir que he estado libre de ésta" (Ayora-Talavera, 1999).

La primera pandemia recordada ocurrió en 1580 se creyó que fue originada en Asia, de ahí se dispersó a África y Europa. En 1849 Charles Creighton, un eminente epidemiólogo británico,

insistió que la influenza no era contagiosa. Sin embargo, al final del siglo XIX el concepto microbiológico de enfermedad había sembrado raíces, preparando el terreno para el descubrimiento de un bacilo en la garganta de algunos pacientes de influenza. Este bacilo, *Haemophilus influenzae* permaneció por muchos años como el agente causal de la influenza. El descubrimiento de la causa viral verdadera fue al final de los años veinte cuando una cepa de virus fue encontrada por primera vez en cerdos. Una cepa relacionada fue finalmente aislada de un paciente humano en 1933 (Ayora-Talavera, 1999).

Un número de acontecimientos históricos de la enfermedad mencionan la interesante coincidencia de la influenza como enfermedad en animales, particularmente en caballos, inmediatamente después o en conjunto con las epidemias en el hombre (Ayora-Talavera, 1999).

Después de largas investigaciones de la transmisibilidad de influenza entre cerdos, Richard E. Shope del Instituto Rockefeller de Patología Comparativa, Princeton, N.J., fue capaz de demostrar que el virus podía ser transmitido entre cerdos con material filtrado. El trabajo de Shope fue notado en Inglaterra, en donde otro intento se realizó para aislar el virus durante una epidemia de influenza humana en 1933. Wilson Smith, Christopher Howard Andrews y P. P. Laidlaw, quienes trabajaban en el Instituto Nacional para la Investigación Médica en Londres, tuvieron éxito al inocular un filtrado de lavado traqueal de humano en la nariz de hurones y producir neumonía en ratones con el material infectado obtenido de los hurones (Ayora-Talavera, 1999).

Los progresos fueron rápidos desde entonces. En 1940 los hurones fueron experimentalmente infectados con un segundo tipo del virus de influenza de humano. La segunda cepa humana fue designada influenza B, para distinguirla del primer tipo encontrado, el cual se hizo conocer como influenza A. Un tercer tipo de influenza, influenza C, fue aislado de un hombre en 1949. Así mismo, en 1940, F.M. Burnet de Australia encontró que los virus de influenza podían multiplicarse en las células de la cavidad alantoidea de embriones de pollo en desarrollo, y un año más tarde George K. Hirst del Instituto de Investigación de Salud Pública de Nueva York, observó que el fluido de los embriones de pollo infectado con influenza podía aglutinar, o agrupar las células rojas de los pollos. Esta hemaglutinación desapareció en calor, lo cual sugirió la presencia de una enzima en el virus que causaba que el virus y la célula roja se disociaran. Estos desarrollos establecieron el estado para futuras investigaciones. La disponibilidad de altas concentraciones de virus de influenza obtenidos de embriones de pollo, dio lugar al desarrollo de vacunas inactivadas para el hombre. La reacción de hemaglutinación pudo ser inhibida por anticuerpos específicos en el suero del hombre o animales infectados o vacunados con virus de influenza. Así un método sencillo hizo posible distinguir entre diferentes cepas de influenza y para medir la respuesta inmune del cuerpo a una cepa dada (Ayora-Talavera, 1999).

En los pasados 100 años, ha habido cinco grandes pandemias comenzando en 1890, 1900, 1918, 1957 y 1968. La llamada influenza asiática que circuló en la pandemia de 1957 fue causada por un virus H2N2, que sustituyó repentinamente al virus H1N1 que circuló en la población humana anteriormente. De manera similar, una nueva cepa pandémica que llegó en 1968, la llamada influenza del Hong Kong, contenía un cambio a H3N2 y rápidamente sustituyó al virus H2N2 que circuló entre 1957 y 1968 (Ayora-Talavera, 1999).

Usando anticuerpos de gente que vivió durante estas epidemias, se ha demostrado que la cepa de 1890 fue un virus H2N8, la cepa de 1900 fue H3N8, y la cepa de 1918 fue un virus H1N1, el cual apareció de nuevo en 1977 y está aún en circulación junto con la cepa H3N2 (Ayora-Talavera, 1999).

El virus de influenza A H2N2 de la pandemia de 1957 llevaba una hemaglutinina y neuraminidasa diferente. En la pandemia de Hong Kong en 1968, el virus de influenza A H3N2 contenía una nueva hemaglutinina, el principal antígeno de superficie. Estudios filogenéticos revelan que estas nuevas glicoproteínas emergentes se originaron de virus de aves y que entraron a la población humana después del rearreglo con cepas de influenza de origen humano. Los virus relacionados a la más devastadora pandemia de influenza en 1918-19, al parecer fueron introducidos a la población humana sin ningún evento de rearreglo. En mayo de 1997, un virus de influenza fue aislado del aspirado traqueal de un niño de 3 años de edad en Hong Kong, quien murió días después de su admisión al hospital. El niño murió de neumonía por influenza, síndrome respiratorio agudo, síndrome de Reye, fallo multiorgánico y coagulación intravascular diseminada. No se le conocía enfermedad alguna antes de ser hospitalizado. El virus no pudo ser caracterizado por la prueba de inhibición de la hemaglutinación (HI). Análisis posteriores demostraron que el subtipo de virus era influenza A H5N1, un subtipo que no había sido previamente identificado en los seres humanos, y ahora se sabe que es de origen aviar con una gran virulencia (Ayora-Talavera, 1999 y Cytos, 2006).

1.2 Clasificación

El virus de la influenza cepa H1N1 estacional y pandémica es un subtipo de Influenza virus tipo A del virus de la gripe, perteneciente a la familia de los Orthomyxoviridae. Al microscopio electrónico, estos virus tienen una apariencia variable y un diámetro promedio de 100 nanómetros (Figura 2) (Yocupicio, 2008).

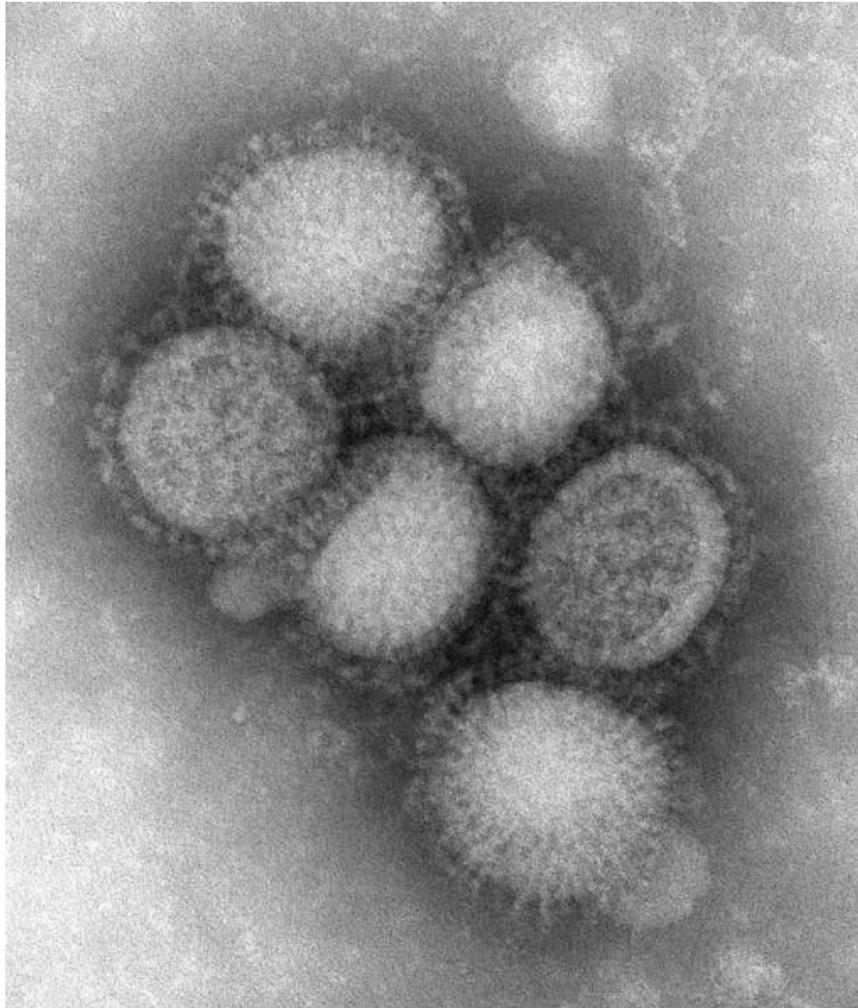


Figura 2: Imagen de microscopía electrónica del virus de la influenza A H1N1, con 50-120 nanómetros de diámetro (www.losarchivosdelatierra.com/storage/fotos, 2009).

Los antígenos básicos tipos A, B y C son determinados por el material nuclear. La Influenza tipo A tiene subtipos que son determinados por antígenos de superficie de hemaglutinina (H) y neuraminidasa (N). Hay tres tipos de hemaglutinina en humanos los cuales son: H1, H2 y H3,

son esenciales cuando el virus ataca a las células. Dos tipos de neuraminidasa: N1 y N2 las cuales tienen un papel en la penetración de los virus en las células (Yocupicio, 2008).

La Influenza A causa una enfermedad de moderada a severa, y afecta todos los grupos de edades. El virus infecta humanos y otros animales. La Influenza B generalmente causa enfermedad menos intensa que el tipo A, y primordialmente afecta a los niños. La Influenza B es más estable, con menor inestabilidad antigénica y consecuencias en la estabilidad inmune. Este afecta solo a humanos y puede ser asociada con el síndrome de Reye (Yocupicio,2008).

La Influenza C es raramente reportada como causa de enfermedad humana, probablemente porque la mayoría de los casos son subclínicos. No ha sido asociada con enfermedad epidémica (Figura 3) (Yocupicio,2008).

Subtipo	humanos	cerdos	caballos	aves
HA (16)	H1	H1	H7	
	H2	H3	H8	
	H3			
N (9)	N1	N1	N7	
	N2	N2	N8	

Figura 3: Subtipos del virus de la influenza que afectan a humanos.
 (<http://www.mednet.cl/.../cursos/1>, Medwave. Año IX, No. 6, Junio 2009).

Desde el punto de vista cronológico este es el orden en el que aparecieron los subtipos:

En 1889 apareció el subtipo H2N8 según un estudio serológico retrospectivo, con un estudio similar se descubrió en 1903 el H3N8, más tarde en 1918 dentro de la trágica pandemia de la gripe española se daba a conocer el subtipo H1N1, en 1957 se desencadenó la gripe asiática de origen aviar con el subtipo H2N2, también de origen aviar fue la gripe de Hong Kong en el año de 1968 encontrando el subtipo H3N2, en 1997 la gripe aviar que surgió en Hong Kong con un genotipo H5N1 causó grandes estragos, la pandemia más reciente iniciada en abril del 2009 en México es un subtipo de H1N1 (Isselbacher, 1994).

La nomenclatura para describir el tipo de virus de la influenza es expresada en este orden:

- 1.- Tipo de virus
- 2.- Sitio geográfico donde primero fue aislado
- 3.- Número de cepa
- 4.- Año del aislamiento
- 5.- Subtipo de virus (Yocupicio, 2008)

Ej. Influenza A virus (A/Memphis/10/1978(H1N1) segment 7

Influenza A virus (A/California/2009(H1N1)) segment 7, complete

La aparición de un nuevo virus de influenza se explica por su variabilidad. Esta característica se puede manifestar por mutaciones asociadas a cambios menores en los antígenos hemaglutinina y neuraminidasa, que no bastan para constituir un nuevo subtipo viral. Estos cambios ocurren porque la RNA polimerasa, la enzima encargada de copiar el material genético, es ineficiente y lenta durante el proceso de replicación, generando alteraciones. Estas mutaciones son las responsables de brotes estacionales de mayor intensidad que lo habitual, como ocurrió, por ejemplo, con la aparición de la cepa Sydney en 1999-2000, una pequeña mutación que enfermó a un número importante de la población. En resumen, los cambios menores se deben a la acumulación de mutaciones en la hemaglutinina y en la neuraminidasa, que generalmente condicionan un escape a la respuesta inmune por lo que ocasionan brotes esporádicos o epidemias anuales limitadas, rara vez pueden ocasionar una pandemia, pero eso ocurrió con el virus H1N1 en 1918 (Yocupicio,2008).

1.3 Patogenia

El virus se transmite por vía aérea mediante aerosoles producidos por la persona infectada al estornudar, toser o hablar y penetra en el sujeto susceptible a través de las vías respiratorias. La gripe se caracteriza por una infección donde el virus se multiplica en las células de las vías respiratorias, conduciendo a un rápido desencadenamiento de un proceso inflamatorio local que se activa secuencialmente, en cascada, con una importante secreción de citocinas, especialmente proinflamatorias, responsables en gran medida del síndrome clínico gripal (Sarmiento, 2009).

El virus de influenza inicialmente infecta de forma local al tracto respiratorio superior, si el virus se extiende hacia el tracto respiratorio inferior puede causar descamación del epitelio bronquial o alveolar hasta la capa basal, y ocasionar neumonía (Figura 4). Además de comprometer las defensas naturales del tracto respiratorio, la infección viral favorece la adherencia de bacterias a las células epiteliales. La neumonía puede deberse al virus o a la infección secundaria por bacterias (Cisterna, 2002).

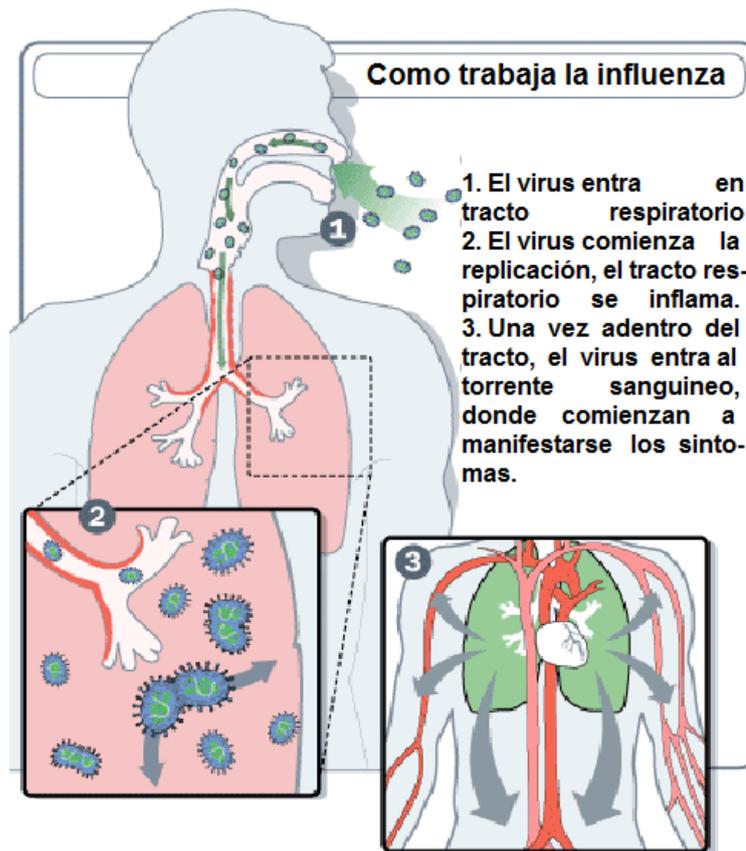


Figura 4: Patogenia del virus de la influenza
 (www.saludycamunicacion.com/.../2008/03/gripe.gif, 2008).

Una vez que el virus ingresa a la célula del tracto respiratorio a través de la acción de la hemaglutinina, comienza la replicación viral. Para que esta continúe, es necesaria la acción de la bomba de protones M2 que facilita el ingreso de iones hidrógeno a través de la envoltura viral. El ingreso de los iones facilita la denudación viral y la liberación de ribonucleoproteínas virales al citoplasma de la célula para que se incorporen al núcleo. Tanto la amantadina como la rimantadina bloquean la bomba de protones M2, lo cual produce la inhibición del ciclo replicativo del virus (Treanor, 2000).

Para que el ciclo replicativo (Figura 5) del virus de influenza se lleve a cabo, requiere la acción fundamental de dos glicoproteínas que se encuentran en su superficie.

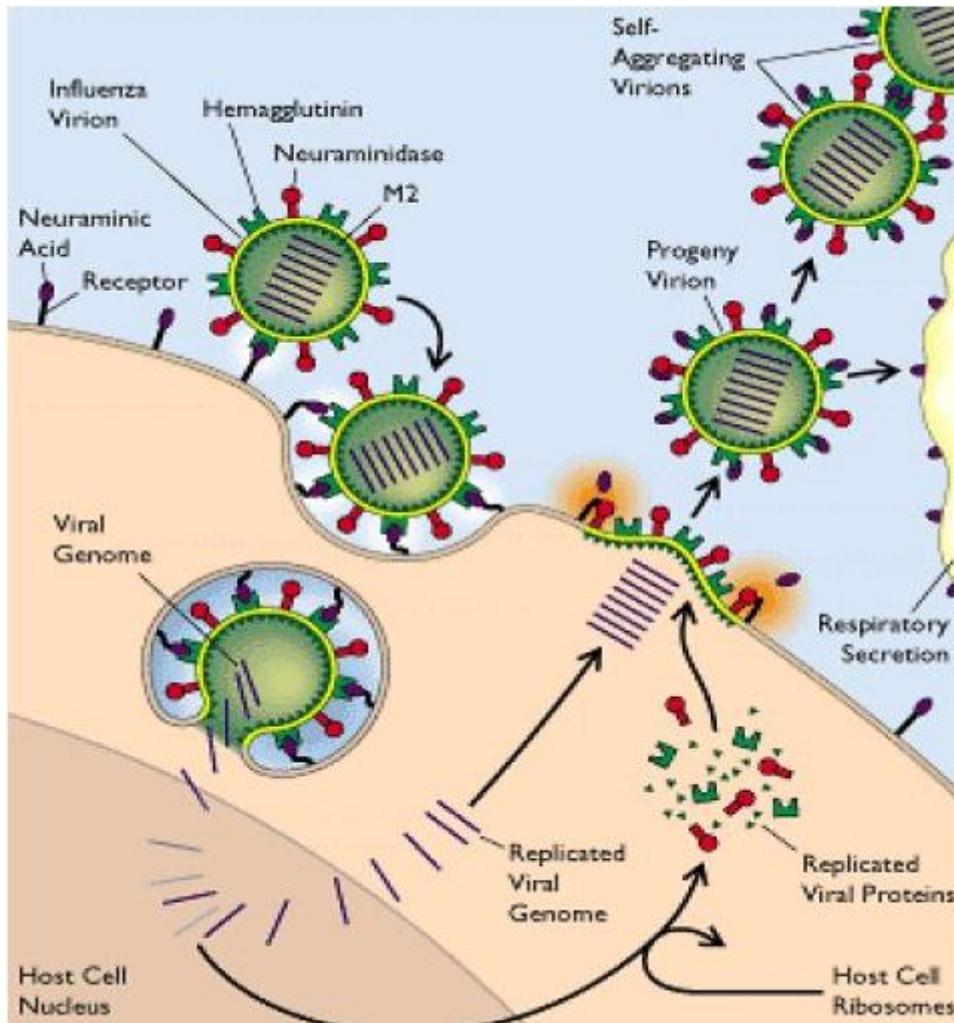


Figura 5: Replicación del virus de la influenza (<http://www.mednet.cl/.../cursos/1>, Medwave. Año IX, No. 6, Junio 2009).

Una se denomina hemagglutinina, responsable de la unión del virus a receptores de las células del hospedero que contienen ácido siálico, lo que permite la fusión de la envoltura viral con la membrana celular y la otra es la neuraminidasa, que hace posible la separación de los residuos de ácido siálico terminales de las glicoproteínas, glucolípidos y oligosacáridos, hecho que permite la liberación de nuevos virus desde las células del epitelio respiratorio (Reiko, 2002).

El virus gripal es relativamente estable en un intervalo amplio de temperatura y humedad, aunque prefiere temperaturas ambientales bajas. Cuando llega al tracto respiratorio superior, se une a los receptores mucoproteicos de las células ciliadas del epitelio respiratorio. Tras la unión del virus a la célula, éste entra en la célula y comienza el ciclo replicativo que dura

alrededor de 6 horas. La replicación del virus se inicia con la participación de una de las dos glicoproteínas esenciales desde el punto de vista patogénico, aunque las dos glicoproteínas de la envoltura viral participan activamente en la infección viral. La hemaglutinina es la responsable principal del poder patógeno del virus. Esta glicoproteína se encuentra en general en forma de precursor, fase en la que el virus gripal no es infeccioso y solamente cuando se encuentra activada el virus gripal puede producir infección. Esta activación se realiza a través de proteasas celulares del tipo de la tripsina, paso esencial para que la hemaglutinina se rompa en dos fragmentos y uno de ellos se combine con los receptores que contienen ácido siálico presentes en las células ciliadas y secretoras de moco del epitelio respiratorio. Posteriormente se continuará con un proceso de internalización por endocitosis, la replicación del material genético del virus, continúa con la formación de nuevas proteínas, para finalizar con el proceso de ensamblaje y liberación del virus que emerge de la célula infectada, por gemación.

En su conjunto, este proceso de formación de nuevas partículas virales tarda algunas horas, y se destaca porque a las 2 horas de la entrada del virus en la célula comienza ya la fase inicial de la infección con una activa participación del núcleo de la célula infectada y a las 4 horas de la infección se produce la incorporación de la proteína matriz con unión de la hemaglutinina y neuraminidasa por una parte, y de la ribonucleoproteína, por otra, lo que da lugar a los nuevos virus (Sarmiento, 2009).

Por otra parte, la otra glicoproteína neuraminidasa, facilita la diseminación y en consecuencia, el inicio de una nueva infección del virus al romper los residuos de ácido siálico del moco, lo que produce su licuefacción. De esta forma, el virus es liberado de la célula infectada con mayor facilidad. Asimismo, este moco licuado ayuda al virus a diseminarse por el territorio afectado y en un primer nivel, ocasiona un proceso inflamatorio con muerte celular y descamación de la mucosa epitelial. El virus se disemina hacia el tracto respiratorio inferior (bronquios, bronquiolos y alvéolos) produciendo una descamación grave del epitelio bronquial o alveolar (Sarmiento, 2009).

1.4 Características del virus de la influenza

1.4.1 Morfología

Todos los virus de influenza comparten características estructurales como el diámetro de 50 a 120 nanómetros, la forma esférica, la presencia de una envoltura o manto y el tipo de genoma. El manto corresponde a una bicapa de lípidos derivados de la membrana celular, de la cual sobresalen alrededor de 500 espículas, conformadas por las glicoproteínas hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (NA). Hacia el interior de la partícula viral, existe una capa formada por la proteína matriz (M) y más al interior, está la nucleocápsula de simetría helicoidal, constituida por los complejos polimerasa y nucleoproteico que incluye el genoma viral. Este es una hebra de ácido ribonucleico (RNA), de polaridad negativa, formada por 12000 a 15000 nucleótidos y segmentada en 7 (influenza C) u 8 fragmentos (influenza A y B) (Figura 6) (Treanor, 2000).

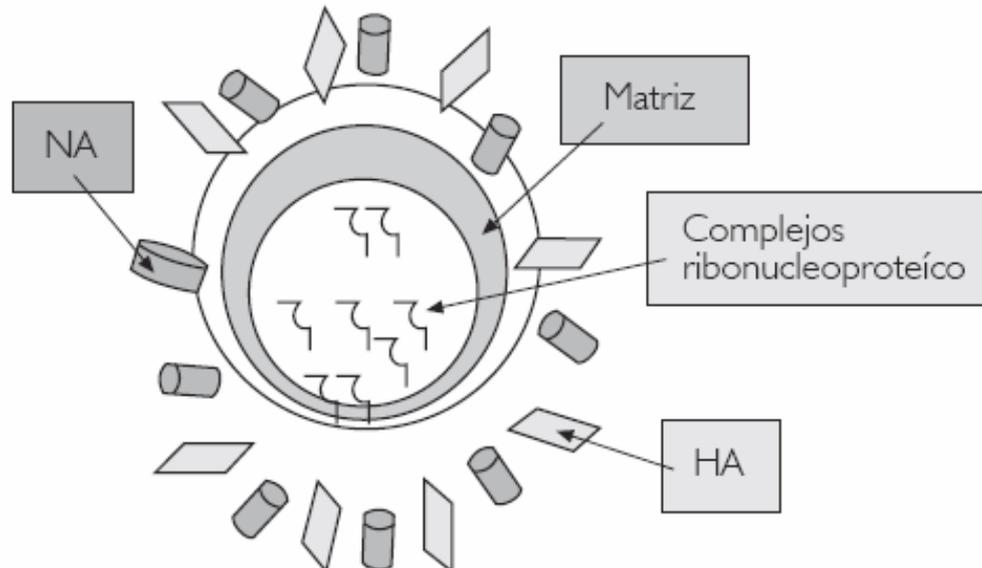


Figura 6: Esquema de una partícula del virus de la influenza (Treanor, 2000).

1.4.2 Organización genómica

El genoma viral está constituido por ocho segmentos de ácido ribonucleico (RNA) de cadena sencilla de distintos tamaños, que varían desde 890 nucleótidos hasta 2,350 nucleótidos. En total el genoma tiene 13 mil 588 nucleótidos y codifica once proteínas virales. Todos los segmentos tienen en sus extremos 5' y 3' regiones no traducidas que son conservadas entre todos los segmentos virales, y que contienen las señales de unión para la polimerasa de RNA del virus, así como las señales necesarias para el empaquetamiento del genoma viral (Arias, 2009).

1.4.3 Variación genética

Los diferentes subtipos de virus influenza se originan por los cambios en los antígenos de superficie H y/o N. Estas variaciones antigénicas ocurren por recombinaciones genéticas o por mutaciones puntuales, fenómenos frecuentes en estos virus debido a la fragmentación del RNA y a la baja fidelidad de la replicación viral. Esta enzima inserta errores durante la síntesis de las nuevas hebras de RNA que no se corrigen por la ausencia de un sistema de reparación, por lo que los virus RNA tienden a tener 10,000 veces más mutaciones que los DNA, lo que en el caso de la HA del virus de influenza A ocasiona cambios de 2 a 3 de sus 250 aminoácidos por año. Estos cambios puntuales se acumulan geográfica y temporalmente, disminuyendo la similitud antigénica entre las antiguas y las nuevas cepas circulantes, ocasionando brotes epidémicos aunque de menor cuantía. Por otra parte, la recombinación de genes puede generar cambios mayores en los antígenos H o N, creando un nuevo subtipo viral capaz de producir epidemias y pandemias. Este proceso ocurre entre cepas de virus influenza de diversas especies (humanos, aves marítimas y domésticas, cerdos, equinos, ballenas, focas) durante una doble infección. Es así como a partir de la coinfección del cerdo con cepas de aves y humanas, se han producido cepas recombinantes de influenza A (Treanor, 2000).

Como la inmunidad que inducen los virus de la influenza es subtipo específica, los anticuerpos que produce el hospedero están dirigidos contra los antígenos de superficie (H y N) del virus que la infecta, y sólo reaccionan en forma cruzada con cepas del mismo subtipo (Treanor, 2000).

Entre los virus de influenza, la virulencia y variación antigénica del A son mayores que las de los tipos B y C, por lo que estas últimas no producen grandes epidemias. En cambio, desde su aislamiento en 1933, se han producido varias pandemias por distintas cepas de virus influenza A como H1swN1 en 1918-19; H2N2 en 1957; H3N2 en 1968 y H1N1 en 1977. En 1997 y 1999, en Hong Kong se detectaron dos brotes por cepas aviarias H5N1 y H9N2, que afortunadamente no se diseminaron; en la actualidad, se han informado casos de influenza aviar en Asia, Europa, África, Canadá y EE.UU. Gran alarma ha causado la detección de perros y gatos infectados. Si bien los virus de influenza aviar generalmente no infectan a humanos, se han confirmado más de 100 casos desde 1997 en Asia y África, la mayoría de los cuales se han adquirido mediante el contacto directo con aves infectadas o superficies contaminadas y la mitad de los cuales ha fallecido. La potencial variación del virus podría determinar la diseminación entre personas, por lo que se ha establecido una estrecha vigilancia de casos humanos. En el 2001, se detectaron cepas H1N2 en Europa y recientemente en América, que no son particularmente agresivas (Treanor, 2000).

A diferencia de otros virus respiratorios, los virus de influenza tienen dos mecanismos diferentes de variación antigénica, lo que les permite infectar a sus hospederos en más de una ocasión y causarles la enfermedad. Este tipo de variaciones se conocen como deriva y cambio antigénicos.

La deriva antigénica resulta de los cambios en las proteínas causados por mutaciones puntuales en los genes las cuales se dan por fallos en la transcripción del RNA (Figura 7) (<http://www.paginadigital.org/articulos/2005/2005terc/tecnologia5/virus-gripe-221005.asp,2005>).

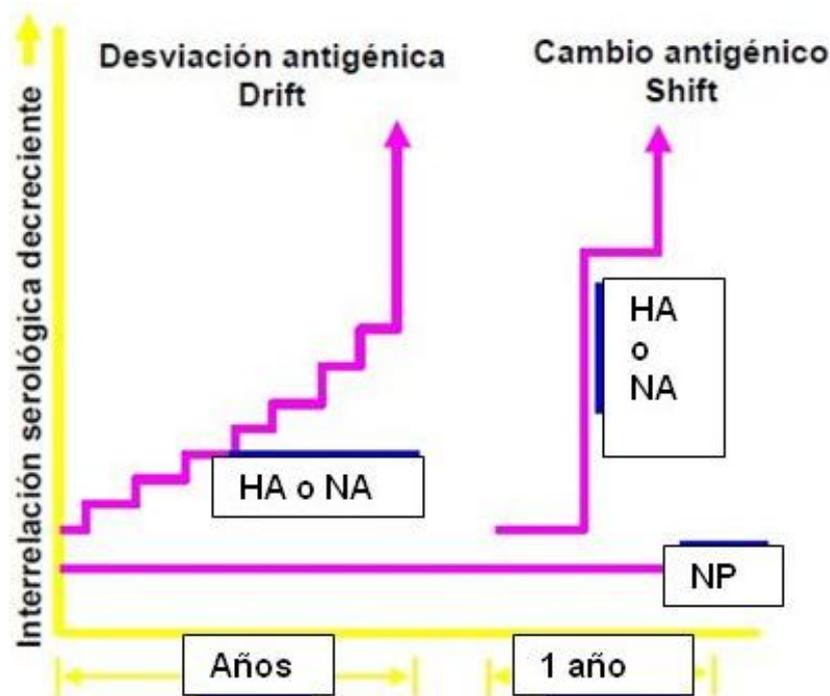


Figura 7: Variabilidad del virus de la influenza(<http://knol.google.co.kr,2009>).

El cambio antigénico se debe a reorganización. En el caso de la influenza A, el cambio antigénico ocurre periódicamente. Aparentemente hay “nuevas” HA y/o NA en las cepas virales circulantes. Hay muy poca inmunidad particularmente si ambas proteínas cambian, o si hay una nueva HA presente y se observa una epidemia/pandemia (<http://pathmicro.med.sc.edu/Spanish-Virology/spanish-chapter13.htm>, 2008).

1.4.4 Proteínas virales

El genoma viral codifica para 9 proteínas. Las proteínas NS1 y NS2 no son estructurales, es decir, están ausentes en las partículas virales, sin embargo, se detectan en cantidades altas en las células infectadas. La proteína NS1 es un inmunomodulador determinando diversos efectos como la inhibición del interferón de tipo I (IFN) en las células infectadas. Las proteínas PA, PB1 y PB2 interactúan con el genoma viral constituyendo el complejo nucleoprotéico y sintetizan

nuevos RNA virales actuando como RNA polimerasa. La nucleoproteína (NP) se asocia a los segmentos del RNA viral y a las polimerasas, conformando la nucleocápsula helicoidal. La proteína M1 forma la matriz y junto a NP, constituyen el antígeno profundo que permite clasificar los virus influenza en los 3 tipos: A, B y C. La hemaglutinina (HA) y la neuraminidasa (NA) son los antígenos de superficie del manto, participando en la patogenicidad viral y determinando los diferentes subtipos de virus. La hemaglutinina es la glicoproteína de superficie más abundante (80%); reconoce receptores específicos de la mucosa respiratoria, permitiendo la adsorción del virus a la célula hospedero (infectividad). En la naturaleza se han descrito variantes (H1 - H16), de las cuales sólo las H1, 2 y 3 afectan al ser humano. La neuraminidasa es una enzima capaz de romper la unión del ácido siálico a la proteína, facilitando la liberación viral, se han detectado 9 variantes de N, de las cuales sólo N1 y N2 infectan a los humanos (Treanor, 2000).

Otra proteína externa del virus, la HA, permite la adsorción viral a receptores celulares que contienen ácido siálico, siendo incorporado a la célula en una vesícula endoplasmática por endocitosis. La acidificación de la vesícula cambia la conformación de la HA e induce la fusión del manto viral con la membrana endocítica, liberando al citoplasma el complejo RNA-nucleoproteína (NP) - polimerasas (PA-PB1-PB2), el cual es transportado al núcleo. Allí se transcriben los 8 RNA mensajeros que originarán proteínas estructurales y no estructurales (NS1, NS2). Los nuevos viriones se ensamblan en la superficie celular y se liberan. En esta etapa, la neuraminidasa juega el papel fundamental de separar el ácido siálico de las glicoproteínas viral y celular, permitiendo la liberación del virus y evitando su aglutinación en la mucosa. En este proceso algunas células mueren por efecto del virus o de la respuesta inmune celular, otras permiten varios ciclos replicativos virales (Treanor, 2000).

La partícula viral tiene una envoltura lipídica en la que se encuentran insertadas tres de las proteínas virales, la hemaglutinina, la neuraminidasa y pequeñas cantidades de la proteína M2. En el interior de la partícula se encuentra la proteína de matriz, que rodea al genoma viral, el cual a su vez está recubierto por un complejo de ácido ribonucleico y proteínas (PB1, PB2 y PA) y la nucleoproteína (NP) (Figuras 8 y 9) (Bouvier, 2008).

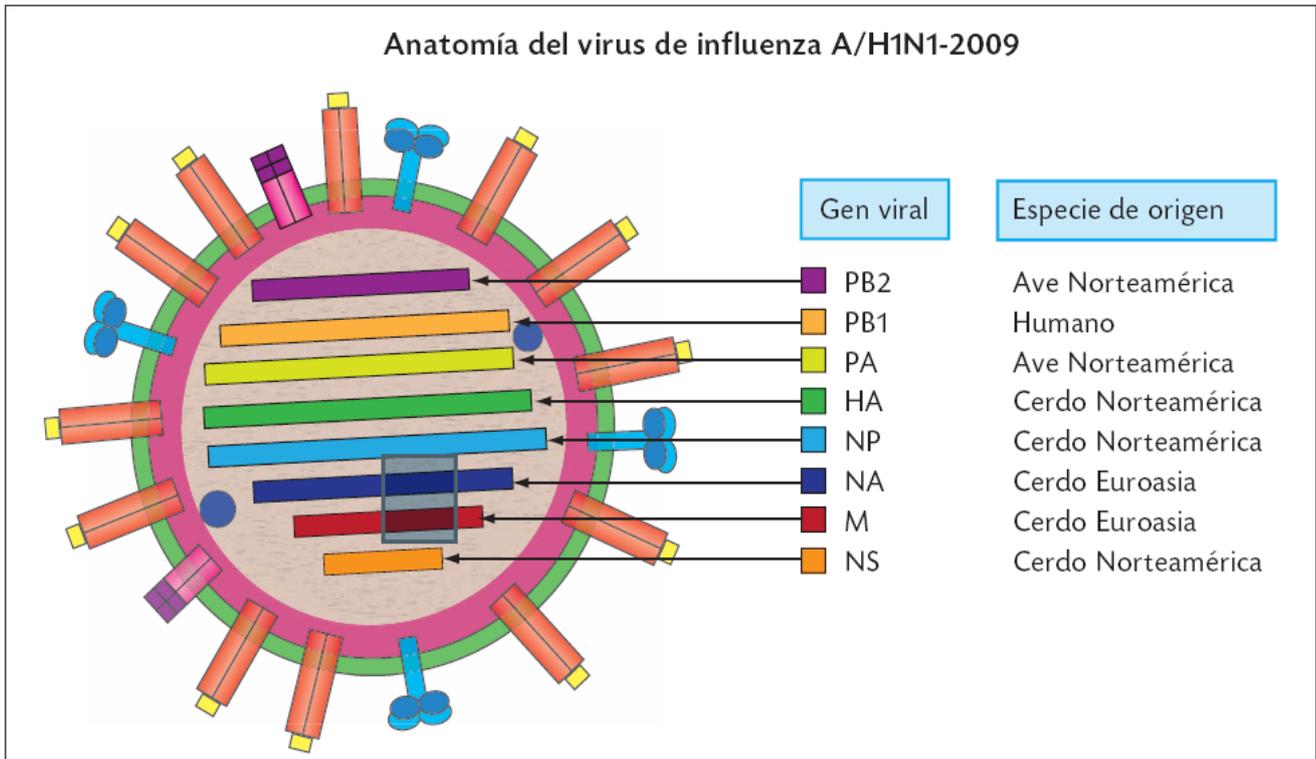


Figura 8: Ilustración de los 8 genes que conforman el genoma viral de la influenza A pandémica, así como la especie donde se originan (<http://pathmicro.med.sc.edu/Spanish-Virology/spanish-chapter13.htm>, 2008).

1.4.4.1 Proteína M2

La proteína de la matriz 2, ilustrada en la figura 9, es el sitio de interés en este proyecto ya que en el codón número 31 de la traducción de esta proteína ocurre el cambio que da origen a la mutación S31N y ésta a su vez hace resistente el virus a los adamantanos.

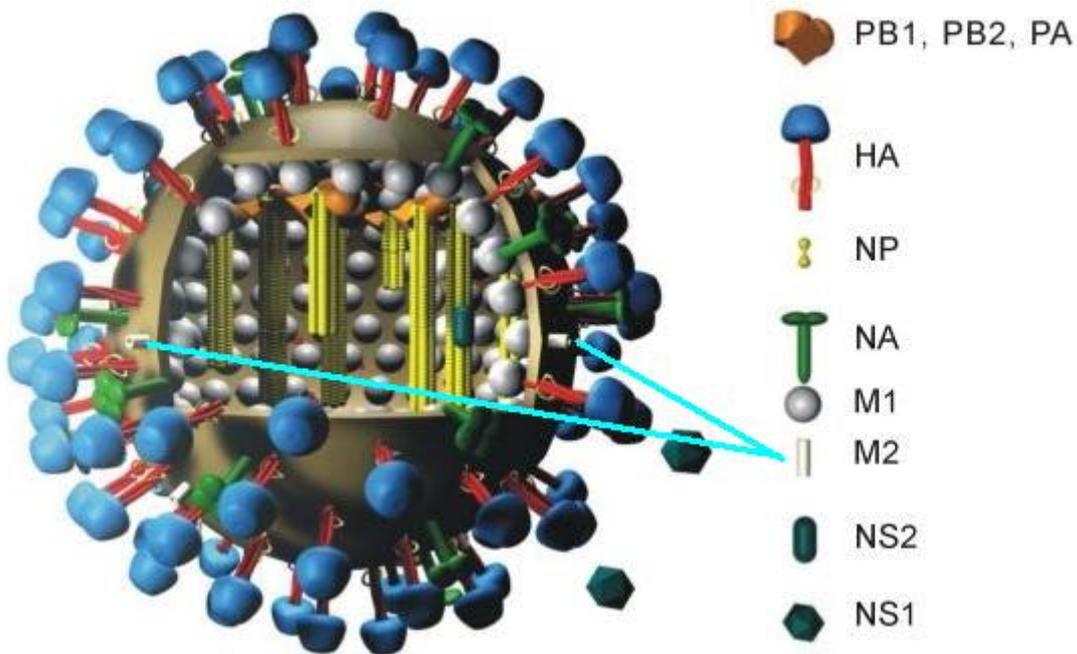


Figura 9: Diferentes proteínas que conforman el virus, se observa la proteína M2 como un canal transmembranal (<http://knol.google.co.kr>, 2009).

La proteína M2 está formada por un homotetrámero que funciona como un canal de iones necesarios para la pérdida de la envoltura del virus en los endosomas y por lo tanto, es esencial para que ocurra una infección (Cytos, 2006).

Cada protómero de la proteína M2 está codificada por el segmento genético 7 (1,027 nucleótidos) del genoma del virus influenza A, conjuntamente con la proteína M1 y está formada por una secuencia de 97 aminoácidos. En esta proteína pueden distinguirse tres partes estructurales y funcionales: a) un dominio extracelular o externo (M2e) N-terminal de 24 aminoácidos (posiciones 1-24); b) un dominio único transmembranal de 19 aminoácidos (posiciones 25-43), y c) una cola citoplasmática C-terminal de 54 aminoácidos (Henkel, 1998 y Cytos, 2006).

Además de su papel durante la infección viral, otra actividad de la M2 es participar en la maduración adecuada de algunas cepas de la hemaglutinina del virus de la gripe (Henkel, 1998).

La proteína M2 es la menos abundante de la cubierta viral. Esta proteína funciona como canal iónico que permite la entrada de protones al interior de la partícula viral, lo que permite la disociación de las nucleoproteínas que se encuentran unidas al genoma viral y la liberación de éste para que sea importado al núcleo e inicie su replicación.

1.4.5 .Antivirales

Desde hace varios años se dispone de antivirales contra el virus de influenza. Los más antiguos son los denominados adamantanos (amantadina y rimantadina), que son activos contra el virus de influenza A. Después de esta primera generación de fármacos antivirales, se desarrollaron los inhibidores de influenza, de los cuales se encuentran disponibles en la actualidad dos fármacos de este grupo: oseltamivir y zanamivir. Los beneficios del tratamiento antiviral adecuado se pueden evaluar considerando varios aspectos:

- Impacto de la gripe (morbilidad, mortalidad, costos)
- Riesgo de pandemia
- Avances en la metodología diagnóstica
- Uso racional de otros recursos terapéuticos (diagnóstico y tratamiento).

Los inhibidores de la neuraminidasa bloquean la acción de esta glicoproteína, evitan la separación de uniones de ácido siálico, impidiendo la liberación de las nuevas partículas virales y evitando, de esta forma, la diseminación de la infección viral a otras células del huésped. La neuraminidasa también cumple otras funciones que facilitan la infección viral, como prevenir la agregación e inactivación viral que producen las secreciones respiratorias al eliminar el ácido siálico presente en la mucina, promover la penetración viral en otras células del tracto respiratorio, potenciar la patogenicidad a través de cambios en la hemaglutinina (<http://www.garrahan.gov.ar/cime/boletines/amanrim.htm>, 2009).

Una de las características más importantes del virus de influenza es su capacidad de producir cambios en la estructura de las glicoproteínas de superficie. Estos cambios se generan a partir de alteraciones en la secuencia de aminoácidos de ciertas porciones de la neuraminidasa y de la hemaglutinina. Una característica importante es el hecho de que, pese a estos cambios, existen áreas de la neuraminidasa que conservan su estructura, lo cual reviste importancia ya que ese es el sitio donde actúan los fármacos inhibidores de la neuraminidasa (Treanor, 2000).

1.4.5.1 Adamantanos

La amantadina y la rimantidina son dos antivirales cuya actividad bloquea selectivamente el canal formado por M2, lo que inhibe la liberación del genoma viral y por tanto su replicación (Chunlong, 2009).

Amantadina

Características farmacológicas de la amantadina

Se administra por vía oral con alta biodisponibilidad, 62% a 93% en adultos jóvenes y 53% a 100% en ancianos, alcanza el pico de concentración entre 2 y 6 horas, y su vida media de eliminación es relativamente prolongada (12 a 16 horas). Este fármaco no se metaboliza por lo que se excreta sin cambios en orina, razón por la cual su vida media plasmática se prolonga en forma considerable en pacientes con falla renal y en ancianos, casos en los cuales la vida media se duplica en relación con poblaciones más jóvenes después de múltiples dosis. Presenta interacciones con fármacos anticolinérgicos y varios fármacos que afectan al SNC, como también con diuréticos, quinina y quinidina. La amantadina no impide la respuesta inmune a la vacuna antigripal. La dosis recomendada varía desde 200 mg por día para adultos sanos hasta 50 a 100 mg por día en niños, y debe adecuarse a la función renal. La duración recomendada del tratamiento es de 10 días, y en caso de profilaxis puede administrarse hasta 8 semanas (Rubin, 2008).

Farmacocinética de la amantadina

Absorción: Es bien absorbida del tracto gastrointestinal.

Vida media: 10-28 horas

Pico sérico: 2.5-4 horas

Unión a proteínas: 59%-67%

Metabolismo: No se metaboliza

Eliminación: 80%-90% es excretada sin cambios en la orina

1.5 Pandemias provocadas por el virus de la influenza

Las pandemias ocurren a intervalos impredecibles, después de 1918 no hubo otra pandemia hasta 1957, después en 1968 y finalmente la pandemia de 1977 que fue de menor magnitud. El virus de influenza B es menos patogénico que el virus de influenza A ya que este no produce pandemias sino pequeños brotes epidémicos en seres humanos. Recientemente se encontró un cadáver en Alaska en el que se identificó el virus de influenza H1N1 pandémico de 1918, el cual se habría originado en cerdos o aves; se aplicó este virus recuperado a un grupo de ratones y se observó que la mortalidad fue cercana a 50%. El virus de la gripe aviar H5N1, aislado en 1997 en Hong Kong, produjo 18 casos y 6 muertes. en 2008 se registraron 390 casos y 246 decesos por virus de influenza H5N1, la mayoría de los cuales se produjo en Indonesia, Tailandia, Vietnam y Camboya. En estos casos la adaptabilidad del virus no ha permitido una transmisión eficaz de humano a humano, pero sucesivas mutaciones podrían conferir un poder pandémico al H5N1 (Fedson, 2003).

Las aves migratorias, especialmente los patos son responsables de muchas transmisiones de un continente a otro, como la que se produjo desde África hacia Nueva York. Estas aves realizan algunas escalas en su jornada de vuelo y en esos lapsos pueden entrar en contacto con aves domésticas y a través de estas, con seres humanos, de esta forma un virus aviar puede llegar al ser humano si logra alcanzar una configuración genética adecuada (Leshner, 2006).

Un virus de subtipo H1N1 resistente al oseltamivir, pero sensible a la amantadina, fue detectado por primera vez en Hong Kong en enero de 2008, en la actualidad esta cepa provoca la influenza estacional donde el número de infectados aumenta en temporada de invierno.

1.5.1 La pandemia del 2009

El virus de influenza A H1N1 pandémica es una nueva cepa de influenza, la población no había sido vacunada ni estaba informada sobre este nuevo patógeno. El virus en su nueva forma también se transmitía de humano a humano ya que investigaciones realizadas en pacientes infectados indicaron que no tuvieron contacto directo con animales como el cerdo, a diferencia de la gripe aviar que era transmitida al convivir con aves infectadas con el virus. Inicialmente todos los decesos a causa del virus se produjeron en México hasta el 29 de abril, en que un niño mexicano de 23 meses falleció en EE. UU. tras acudir allí para su tratamiento. El número creciente de casos alrededor del mundo y la expansión de decesos por gripe porcina fuera de las fronteras mexicanas hizo que la OMS elevara el nivel de riesgo a 5 indicando que se trataba de una pandemia (WHO, 2009).

La OMS no descartaba la posibilidad de una fuga del virus de algún laboratorio de investigación, mientras el contagio seguía creciendo a nivel mundial. Para mediados de mayo, Japón había desplazado a España del cuarto lugar en número de afectados (WHO, 2009).

El 17 de mayo, México entregó a la OMS la cepa del virus A H1N1 y la información clínica y epidemiológica de la enfermedad. Los países en desarrollo encabezados por Indonesia, Tailandia, India, Nigeria y Brasil solicitaron un mejor acceso a las vacunas que se esperaba fueran desarrolladas en los próximos meses solicitando la tecnología para fabricarlas ya que habían aportado cepas para elaboración de vacunas, lo cual provocó un choque de intereses entre las compañías farmacéuticas (WHO, 2009).

El peor escenario sería el encuentro y recombinación genética del actual virus A H1N1 con el virus aviar A H5N1 de tal manera que el virus resultante adoptaría la mortalidad de las dos cepas teniendo un 90% de mortalidad (WHO, 2009).

En este tiempo surge el temor de que la nueva cepa adquiriera resistencia a los antivirales por mutación o por combinación con cepas previas, pues una cepa estacional del A H1N1 en Estados Unidos ya era resistente al oseltamivir, amantadina y solo era combatible con zanamivir el cual se administra por nebulización. Otro temor es que en una segunda onda el virus sea más agresivo como fue el caso de la gripe española (Horimoto, 2001).

El 11 de junio de 2009, oficialmente la OMS declaró que se trataba de una pandemia nivel 6 y que el virus se contagiaba persona a persona en varias regiones del mundo, algo que no indica mayor gravedad en su virulencia (Horimoto, 2001).

El virus de la influenza A H1N1 ha mutado en diversos subtipos que incluyen la gripe española, la gripe aviar, la gripe porcina, y la gripe bovina. La cepa mantuvo su circulación después de haber sido reintroducida en la población humana en los años 1970 (Horimoto, 2001).

En la actualidad, existen algunas mutaciones del virus H1N1 en la vida silvestre, las cuales causaron al menos la mitad de infecciones de gripe ocurridas durante el año 2006.

Desde marzo de 2009, al menos 900 casos mortales ocurrieron en Europa y América por la pandemia de una nueva cepa de H1N1, otras 100 muertes en México aún no estaban oficialmente confirmadas como casos de influenza H1N1.

La situación al 14 de junio del 2009 registrada por la OMS era de 29.669 casos confirmados de gripe provocada por la nueva cepa del virus H1N1 y cientos de casos mortales en total a nivel mundial. Se hizo un seguimiento diario de los últimos datos publicados por la OMS, el número de pacientes declarados se duplico cada 2 semanas (Gráfico 1) (<http://www.who.int/csr/disease/swineflu/en/>, 2010).

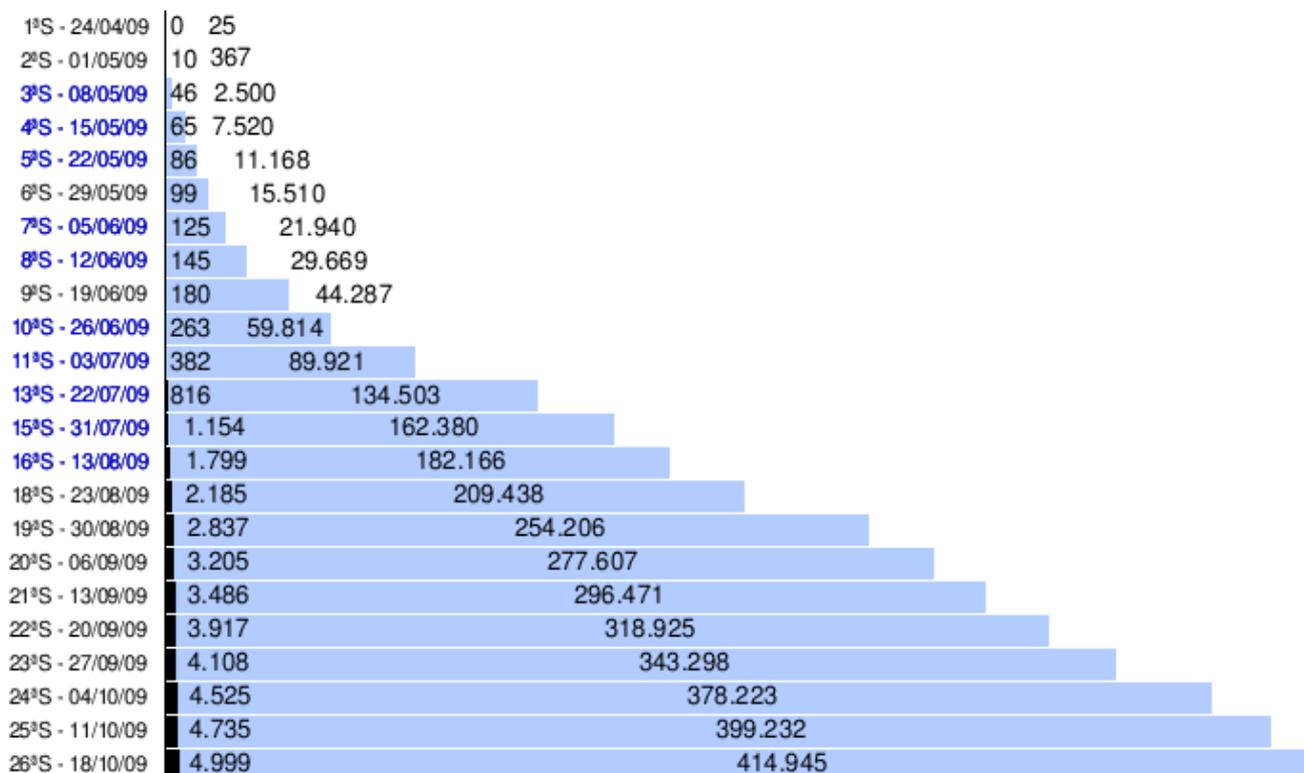


Gráfico 1: Datos oficiales publicados por la OMS con confirmación serológica, hasta el 18 de octubre del 2009, OMS (<http://www.who.int/csr/disease/swineflu/en/>, 2010).

Los casos confirmados de influenza durante la pasada alerta pandémica fueron aumentando de manera alarmante por lo que se realizó una distribución de casos a partir de que empezaron los síntomas en los pacientes, en esto se basó en gran parte la toma de las decisiones para contener la pandemia (Gráfico 2) (<http://www.who.int/csr/disease/swineflu/en/>, 2010).

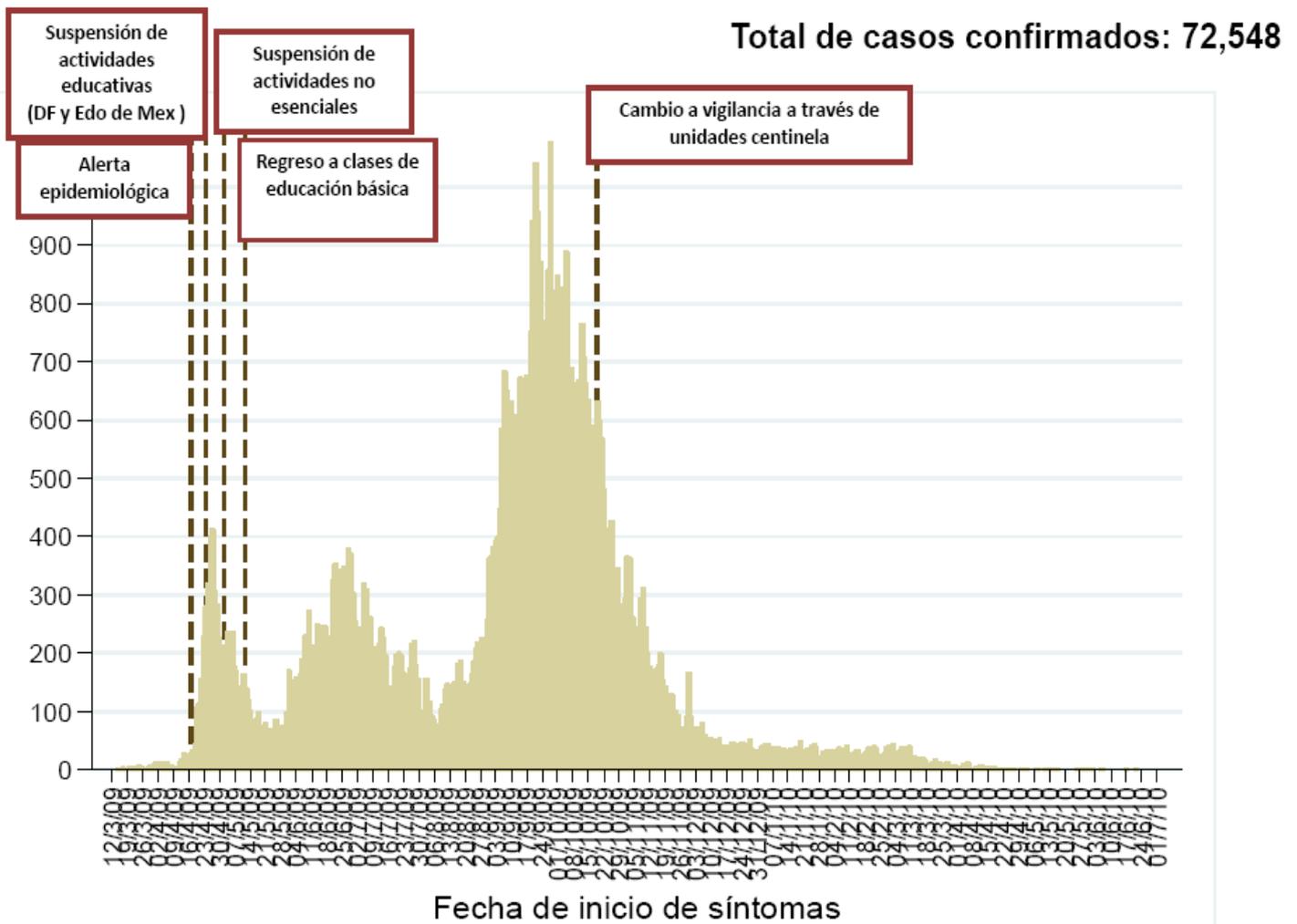


Gráfico 2: Distribución de los casos confirmados de acuerdo a la fecha de inicio de síntomas, InDRE (<http://portal.salud.gob.mx/contenidos/noticias/influenza>, 2009).

En cuanto al ámbito internacional también se obtuvieron cifras preocupantes ya que la siguiente tabla muestra el total de las defunciones con influenza A H1N1 pandémica (Tabla 1).

Tabla 1: Casos y defunciones a causa de influenza A H1N1 pandémica, OMS(<http://portal.salud.gob.mx/contenidos/noticias/influenza>, 2009).

	Total Acumulado
Regiones	Muertes
Oficina Regional de la OMS para África (AFRO)	168
Oficina Regional de la OMS para las Américas (AMRO)	Al menos 8,462
Oficina Regional de la OMS para el Mediterráneo Oriental (EMRO)	1,019
Oficina Regional de la OMS para Europa (EURO)	Al menos 4,879
Oficina Regional de la OMS para el Sudeste Asiático (SEARO)	1,866
Oficina Regional de la OMS para el Pacífico Occidental (WPRO)	1,845
Total	Al menos 18,239

1.6 Mutación S31N.

La resistencia a los adamantanos es producida por un cambio de un aminoácido en la secuencia del gen M. La mutación S31N, es un cambio de aminoácido serina (S) por asparagina (N), conocida como mutación génica de sustitución de bases, dándose una transición, el cambio de una purina (A) por purina (G).

La mutación S31N es producida probablemente por variabilidad genética y en ocasiones los pacientes desarrollan resistencia a los adamantanos por mezclas de 2 o mas virus dentro de su carga viral, donde el virus con mayor porcentaje de carga viral infecta a las células y se manifiestan las características propias de ese virus, en este caso si dentro de la carga viral de un paciente tenemos un 60% Influenza H1N1 pandémica o humana y el otro 40% es influenza H1N1 estacional, se expresa la resistencia a los adamantanos y sensibilidad al oseltamivir (Schmidtke, 2006).

Capítulo II

2.1 Justificación:

La detección de la mutación S31N del virus de influenza A H1N1, es de gran interés ya que confiere resistencia del virus a antivirales como lo son la amantadina y rimantidina, esta mutación se detecta por medio de técnicas moleculares.

La importancia por ofrecer un diagnóstico preciso y oportuno ante una contingencia mundial provocada por una cepa mutada y así aplicar un tratamiento farmacológico adecuado exige plantear un método para la detección de la mutación, el cual no se realizaba en México, se partió de un protocolo de CDC, el cual se adaptó a las condiciones y tecnología con la que se cuenta en el InDRE, estandarizando y optimizando técnicas moleculares como lo son la RT-PCR y secuenciación capilar.

2.2 Objetivos

General

Detectar la mutación S31N en el virus de la influenza A H1N1 pandémica que confiere resistencia a los adamantanos por medio de un método molecular para ofrecer un diagnóstico rápido y preciso a pacientes infectados con el virus.

Particulares

1.- Obtener RNA viral correspondiente al virus de la Influenza A H1N1 pandémica a partir de cultivo celular y muestras biológicas de pacientes infectados para evaluar la eficacia del método.

2.- La estandarización y optimización de una técnica de PCR y secuencia de DNA para la detección de marcadores moleculares que confieren resistencia a adamantanos en virus de influenza A H1N1 pandémica.

3.- Analizar los datos moleculares de la secuencia del material genético obtenido por medio de herramientas bioinformáticas para confirmar o descartar cepas sensibles y/o resistentes.

Capítulo III

Estrategia experimental

El análisis de iniciadores previo al trabajo experimental se realizó con múltiples alineamientos en Clustal X, donde los iniciadores tanto sentido como contrasentido se alinearon con diferentes secuencias del virus Influenza A H1N1 pandémica no solo de México sino de todo el mundo. Al comprobar que los iniciadores eran viables para alinearse y amplificar en el sitio requerido del gen, se mandó a sintetizarlos.

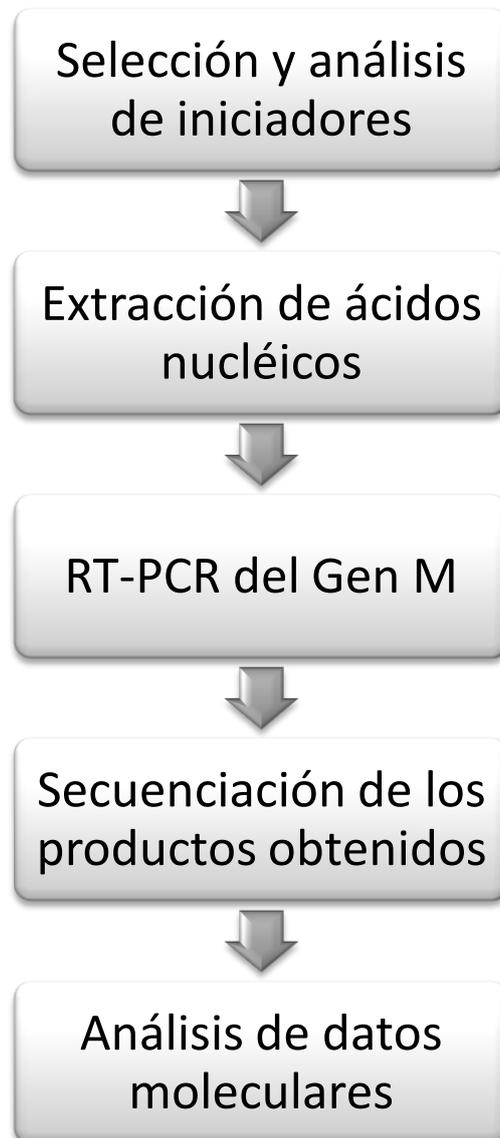
Utilizando el concentrado del sobrenadante del cultivo celular infectado con el virus de la influenza A H1N1 pandémica, muestras biológicas de pacientes infectados y defunciones proporcionadas por hospitales y clínicas del sector salud, se extrajo el RNA de un número total de 113 muestras por el método automatizado QIAcube de Quiagen.

Posteriormente se utilizaron 2 protocolos de RT-PCR para estandarizar el método que mejor se ajustara al producto de 230 pb de la proteína M2. Después se comprobó la presencia, tamaño y concentración del producto por medio de una cuantificación en un DNACHIP usando el bioanalizador Agilent 2100.

Al conocer la concentración del producto se purifican con la enzima ExoSap, después de esto se preparan para la reacción de secuencia por medio de una PCR lineal donde se usan los ddNTPs marcados con fluorocromos como sustrato de la reacción.

Al término de la reacción se hace una segunda purificación por medio de columnas a través de sílica gel, posteriormente, se abren las hebras del DNA por medio de temperatura y se aplica un choque térmico sumergiéndolas en hielo para luego realizar la medición en el secuenciador capilar de Applied Biosystems 3130xl, al término de la lectura las secuencias se analizan con herramientas bioinformáticas como lo son: Sequencing Analysis, Chromas, BioEdit, Clustal X y Blast de NCBI.

Grafico 3: Flujograma de trabajo



3.1 Material

3.1.1 Equipo

- Robot de extracción QIAcube
- Gabinete de PCR
- Termociclador GeneAmp Applied Biosystems 9700
- Bioanalizador Agilent 2100
- Centrifuga Heraeus Labofuge 400
- Centrifuga de vacío Jouan
- Microcentrifuga Hemle Z160M
- Balanza digital PCE- BSH
- Secuenciador capilar AB 3130xlGeneticAnalyzer
- Vortex Scientific 1

3.1.2 Accesorios

- Consumibles del robot extractor)
- Micropipeta de 0.1 – 2 μ L
- Micropipeta de 1 – 10 μ L
- Micropipeta de 10 – 100 μ L
- Micropipeta de 20 - 200 μ L
- Micropipeta de 100 – 1000 μ L
- Puntas para micropipeta con filtro de 10 μ L
- Puntas para micropipeta con filtro de 100 μ L
- Puntas para micropipeta con filtro de 200 μ L
- Puntas para micropipeta con filtro de 1000 μ L
- Tubos eppendorf con tapa de 0.2mL
- Tubos eppendorf con tapa de 0.5 mL
- Tubos eppendorf con tapa de 1 mL
- DNAChip DNA100
- Placas de centrisep purificación estériles de 96 pozos

- Columnas centrisep de purificación Quiagen
- Placasópticas con volumen para 1 mL de 96 pozos
- Septas para placa de 96 pozos

3.1.3 Reactivos

- Estuche de reactivos QIAmp para RNA viral
- Estuche de reactivos DNA 1000
- Estuche Invitrogen SuperScript III
- Estuche de reactivos para secuencia BigDye Terminator v3.1 POP-7
- Hi-Di formamida
- Enzima Exonucleasa I Exosapit
- Iniciadores sentido y contrasentido:
Primer Fow sw-M2-F670, AGC TCC AGT GCT GGT CTG AAA G
Primer sw-M2-R900-biot, GAC TCA GGC ACT CCC TCC GTA GAA.[29]
- Productos de PCR cuantificados en unidades de [ng/μL]

3.1.4 Muestras biológicas

- Muestras biológicas obtenidas en hospitales y clínicas del sector salud a nivel nacional, INER, Hospital de pediatría, Centro Médico La Raza, CDC, InDRE y la Red Nacional de Laboratorios de Salud Publica:
- Muestras de Cultivos virales primarios
- Muestras de Biopsia bronquial
- Muestras de Exudado nasal y faríngeo
- Muestras forenses maternas

3.2 Métodos

3.2.1 Selección de iniciadores.

- 1) Se realiza una búsqueda a fondo de fuentes de información primaria como publicaciones científicas.
- 2) Con la información recopilada se da paso a identificar la región del gen que interesa, así como el sitio donde se encuentra el cambio de nucleótido y las posibles regiones conservadas donde se adhiere el iniciador
- 3) Se recopilan los iniciadores encontrados en dichas publicaciones cuando han sido usados para RT-PCR y así poder evaluar si son aplicables al método escogido.
- 4) Se tiene la secuencia completa del gen M de influenza A H1N1 pandémica en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.
- 5) Se evalúan los iniciadores encontrados haciendo un alineamiento local en BLAST o haciendo múltiples alineamientos en Clustal X.

3.2.2 Método para extracción de RNA viral.

A las muestras recolectadas en distintas dependencias pertenecientes a la Secretaria de Salud en todo el país, se le aíslan los ácidos nucleicos por un proceso de extracción automatizada.

- 1) Se prepara el equipo QIAcube.
- 2) Se cargan las muestras máximo 12 usando 140 μ L como volumen
- 3) Se programa la extracción ingresando en el menú a la opción de "Virus" con el protocolo de RNA viral de fluido corporal e iniciar
- 4) Se recupera el extracto de RNA, se desechan los consumibles y se limpia el equipo físicamente.

La extracción automatizada se inicia tomando un volumen de 140 μ L de muestra biológica inactivada o bien de sobrenadante de cultivo celular, la muestra se mezcla con corredor de RNA y buffer AVE, se inicia la lisis con el buffer AVL , una serie de lavados con buffer AW1 y AW2 y más tarde la elución utilizando etanol al 100%, el robot QIAcube envasa el extracto con

un volumen final de 60 μL , en un proceso que dura aproximadamente de 45 minutos a 1 hora, teniendo el volumen resultante se adicionan 5 μL de RNA a cada muestra para RT-PCR.

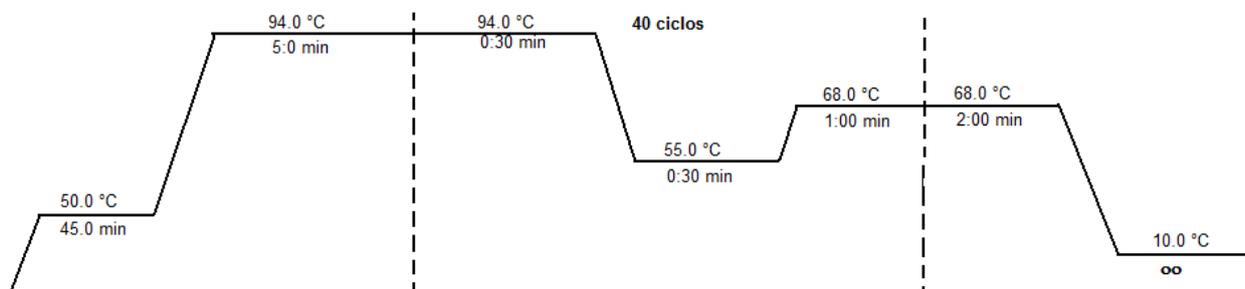
3.2.3 Método para RT-PCR.

- 1) Se enciende el gabinete de PCR y se desinfecta con etanol 70% y gasa estéril
- 2) Se prepara la mezcla de reacción (Buffer, Primer sentido y contrasentido, agua grado PCR, dNTP's y RT/ taq)

Tabla 2: Protocolo de mezcla "Master mix" para RT-PCR de Influenza A H1N1

Protocolo para RT-PCR punto final	
Buffer 2X	12.5 μL x n. de muestras
Primer F	1 μL x n. de muestras
Primer R	1 μL x n. de muestras
RT / Taq	0.5 μL x n. de muestras
Agua	5 μL x n. de muestras

- 3) Se agregan 5 μL de muestra a cada tubo
- 4) Se edita el siguiente programa: 45 minutos a 50°C para retro transcripción, 5 minutos a 94°C para el proceso de iniciación, 40 ciclos para la etapa de desnaturalización (30 segundos a 94°C), alineamiento (30 segundos a 55°C) y elongación (1 minuto a 68 °C), finalmente se mantiene a una temperatura de 10°C.
- 5) Se realiza la reacción de PCR en el termociclador programado



- 6) Se sacan las muestras rotuladas y se almacenan a 4°C.

Durante la preparación de la RT-PCR se trabaja en un área limpia, dentro de un gabinete de PCR y se usan reactivos de el mismo lote, se realizan buenas prácticas de laboratorio, y así se evita contaminación, teniendo un cuidado especial con la enzima Taq polimerasa y los extractos de RNA, estos se protegieron de temperaturas elevadas, además de incluir un control negativo para descartar problemas en el flujo de trabajo.

3.2.4 Método para cuantificación

- 1) Se abre el programa Expert Agilent 2100 en PC
- 2) Se elige el protocolo para DNA 1000
- 3) Se registran las muestras en la PC
- 4) Se presuriza el DNAchip en la estación de cebado, oprimiendo la jeringa asegurando el émbolo hasta hacer click y contar 1 minuto, pasando el minuto se libera la jeringa.
- 5) Se agregan 9 μL de gel colorante en el pozo marcado con una **G** en medio de un círculo
- 6) Se repite el proceso de presurización del DNAchip
- 7) Se agregan 9 μL de gel colorante en los dos pozos restantes marcados con una G
- 8) Se agregan 5 μL de marcador de alto y bajo peso molecular en cada uno de los 12 pozos para muestra y en el pozo marcado con una escalera
- 9) Se agrega 1 μL de Ladder en el pozo que está marcado con una escalera
- 10) Se agrega 1 μL de muestra en cada uno de los 12 pozos siguiendo el orden en el cual fueron registrados en la PC.
- 11) Se introduce el DNAchip al vortex y se agita a 1500 rpm durante 1 minuto.
- 12) Se introduce el DNAchip en el bioanalizador y se inicia la lectura.
- 13) Al termino de la lectura se saca el DNAchip
- 14) Se usa el CleanerChip agregándole 300 μL de agua grado PCR y se introduce en el bioanalizador cerrando la tapa durante 3 minutos, para la limpieza de los electrodos
- 15) Se obtienen los datos emitidos por el instrumento (Gel, electroferograma, concentración y tamaño del amplicon)

El control negativo que se utilizo en la RT-PCR se analiza junto con las muestras para comprobar el correcto estado de los reactivos, la calidad de la técnica y se descarta contaminación en la reacción (Njafov, 2008).

3.2.5 Método para secuencia y análisis de datos moleculares.

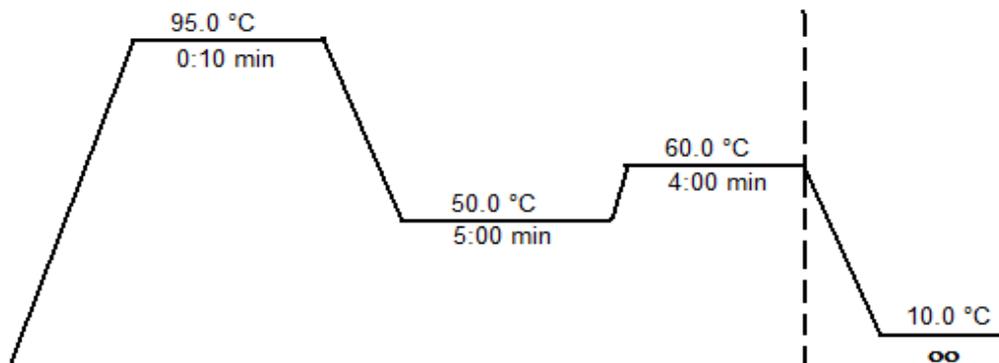
- 1) Se realiza el cálculo conforme lo indica la Tabla No. 3 para saber el volumen necesario de DNA para el proceso de purificación y secuenciación según el tamaño del amplicon y la concentración que resulto de la cuantificación

Tabla 3: Cantidad de DNA requerida según el número de bases en el fragmento.

Tamaño del producto de PCR	Cantidad de DNA requerida
100 - 200 pb	1 - 2 ng
200 - 500 pb	3 - 10 ng
500 - 1000 pb	5 - 20 ng
1000 - 2000 pb	10 - 40 ng
>2000 pb	40 - 100 ng

- 2) Se rotulan tubos para la purificación con la enzima EsoSAP-IT
- 3) Se mantiene en hielo el vial de la enzima, se agregan 0.5 μ L de la misma por cada 5 μ L de producto de PCR. El tratamiento con Exonucleasa I degrada los iniciadores de PCR residuales mientras que, la fosfatasa alcalina (Shrimp Alkaline Phosphatase) defosforila los dNTPs sobrantes. Tras la inactivación por calor de ambas enzimas puede emplearse el producto de PCR en la secuenciación automática [30]
 Nota: Los tubos que ya contengan la enzima se deben mantener rodeados de hielo, esto para evitar que la enzima reaccione al aumentar la temperatura
- 4) Encender Termociclador GeneAmp 9700 de Applied Biosystems y editar programa: 15 minutos a 37°C , se inactiva la enzima a 80°C por 15 minutos, después se mantiene a una temperatura de 4°C
- 5) Se realiza la reacción de ExoSAP-IT en el termociclador programado con tiempos, temperaturas y ciclos adecuados
- 6) Se prepara de la mezcla de reacción en muestras que tengan el mismo volumen de DNA según la tabla mencionada anteriormente (Vol. agua grado biología molecular, 2 μ L Gel BigDye, 3 μ L de Buffer)

- 7) Se agrega la cantidad necesaria de mezcla a cada tubo según el volumen de DNA requerido
- 8) Se agrega 1 μL de iniciador específico a concentración 3.3 pmol en cada tubo
- 9) Se agrega el volumen de muestra correspondiente teniendo en total 20 μL y agitar con vortex
- 10) Se edita el nuevo programa: 10 minutos a 95 °C para desnaturalización, 5 minutos a 50°C de alineamiento, 4 minutos a 60°C de elongación durante 40 ciclos, finalmente se mantiene a 10°C
- 11) Se deja que se realice la reacción de secuencia en termociclador con las condiciones optimas:



- 12) Finalizada la reacción se sacan las muestras del termociclador
- 13) Se purifican los productos de extensión (17 a 96 muestras):
 - a. La placa de purificación que se encuentra a 4°C se atempera a temperatura ambiente durante 1 hora
 - b. Se quitan las protecciones de la placa, se nivela en la balanza digital usando una placa en desuso, y se centrifuga a 3000 rpm durante 3 minutos para eliminar el líquido de hidratación
 - c. Se coloca la placa de purificación deshidratada sobre la placa óptica de 96 pozos para secuenciador 3130xl de 1 mL de volumen y posteriormente se agrega el volumen de cada una de las muestras en el centro del pozo correspondiente de la placa sin tocar la silica, de acuerdo al orden en el que sean registradas para su lectura en el secuenciador

- d. Se balancea la placa en balanza digital y después se centrifuga por 3 minutos a 3000 rpm para eluir a través de la sílica hacia la placa óptica de 96 pozos
 - e. Finalizada la centrifugación se retira la placa de purificación
 - f. Se tapa la placa con la septa
 - g. Se coloca la placa óptica en el termociclador durante 5 minutos a 95°C para abrir las cadenas
 - h. Se colocar la placa en hielo durante 2 minutos provocando un choque físico térmico para mantener las cadenas abiertas
 - i. Finalizados los 2 minutos en el hielo se verifica que en la placa no haya burbujas en el fondo de los pozos, de haber burbujas se extraen con una punta para pipeta que se encuentre estéril
 - j. Se coloca la placa en el lugar correspondiente del "Autosampler" dentro del secuenciador 3130xl
2. Para la purificación de los productos de extensión de (de 1 a 16 muestras):
- a. Se rotulan las columnas (pared y tapa) y los tubos de colección
 - b. Se homogeniza la sílica de cada columna agitando con un vortex, cuidando que no se formen burbujas
 - c. Se afloja la tapa de cada columna y se rompe la punta de plástico
 - d. Colocar cada columna en su tubo colector
 - e. Se centrifugan las columnas a 3500 rpm durante 3 minutos, para eliminar el líquido de hidratación
 - f. Se colocan las columnas en el tubo de colección correspondiente.
 - g. Se coloca en el centro de cada columna (sin tocar la sílica) cada una de las muestras según corresponda
 - h. Se centrifugan las columnas a 3500 rpm durante 3 minutos, colocando el pico de sílica formado hacia la pared de la centrífuga
 - i. Se colocan los tubos de recolección en la centrifuga evaporadora por 15 minutos para evaporar el agua de las muestras en oscuridad

- j. Se agregan 16 μ L de Hi Di formamida (Dar estabilidad a las cadenas de DNA) a cada tubo de colección para suspender el producto y agitar vigorosamente con el vortex (evitando que el producto se quede en las paredes del tubo)
 - b. Se coloca cada una de las muestras en el pozo correspondiente de la placa de acuerdo al orden en el que sean registradas para su lectura en el secuenciador
 - a. Se tapa la placa con la septa
- 14) Se registran las muestras en PC, usando Data Collection, software de Applied Biosystems, generando una nueva corrida en "Plate manager"
- 15) Se enciende la estufa, se liga la placa y se verifica el estado del equipo en "Instrument Status"
- 16) Se inicia la corrida de secuencia
- 17) Se guardan las secuencias en formato ABI para su posterior análisis
- 18) Al terminar la colección de datos se ingresa a "Sequencion Analisis" para analizar los datos crudos
- 19) Se usa el programa Chromas para editar las secuencias traducidas a electroferogramas
- 20) El alineamiento múltiple se realiza en el programa Clustal X
- 21) Para traducir los nucleótidos a proteína en forma de aminoácidos, se usa otro programa llamado BioEdit, para el cual necesitamos antes que nada obtener una secuencia de referencia del gen M2, esta misma debe tener un marco de lectura correcto

Capítulo IV

Resultados y Discusión:

La selección de los iniciadores se basa en un protocolo de la OMS-CDC (WHO, 2009) para la detección de resistencia a amantadina por pirosecuencia, la secuencia de cada iniciador es la siguiente:

F670: AGCTCCAGTGCTGGTCTGAAAG

R900: GGACTCAGGCACTCCCTCCGTAGAA

Estos iniciadores con una $T_m = 50^\circ\text{C}$ fueron analizados antes de sintetizarse por medio de alineaciones usando una herramienta bioinformática la cual se localiza en la red, llamada por sus siglas en inglés BLAST (Basic Local Aligmen Search Tool), el propósito de estos alineamientos es comprobar si los iniciadores analizados se adhieren específicamente al sitio de interés.

Iniciador F670

```
Query 1 AGCTCCAGTGCTGGTCTGAAAG 22
      |||
Sbjct 700 AGCTCCAGTGCTGGTCTGAAAG 721
```

Iniciador R900

```
Query 22 GGACTCAGGCACTCCCTCCGTAGAA 46
      |||
Sbjct 931 GGACTCAGGCACTCCTTCCGTAGAA 907
```

Los iniciadores se alinean perfectamente en el sitio deseado correspondiente al fragmento que codifica para la proteína M2 en influenza A H1N1 pandémica (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, 2010).

Durante la optimización de la RT-PCR se probaron cambios de temperatura en alineamiento y de igual forma se intentó con diferentes tiempos de retro transcripción, en el primer programa que se uso para la RT-PCR, el tiempo de retro transcripción era de 60 minutos, más tarde se bajo a 55 minutos para finalmente quedar en 45 minutos a 50 grados centígrados sin afectar el rendimiento de material genético obtenido, ya que las concentraciones varían dependiendo de las condiciones de calidad en que se encuentren las muestras y qué tan degradado está el RNA, es importante saber, que en este paso la temperatura no fue modificada.

Por otra parte, la temperatura de alineamiento que al principio era de 55 grados centígrados, se aumento a 60 grados sin tener un cambio favorable en el comportamiento de la reacción, por lo que se opto por usar la temperatura propuesta inicialmente que es de 55 grados centígrados (Njafov, 2008).

Para la reacción de RT-PCR se usaron los iniciadores, F670 y R900, además, un tercer iniciador fue probado como iniciador interno en el proceso la de secuencia (F747:5'-GCGATTCAAGTGATCC-3') (Varough, 2010) (Figura 10).

A continuación se muestra en la figura 10, el mapa donde se ubican los iniciadores en el gen M ya que en la reacción de RT-PCR se tiene un producto de 230 pb aproximadamente y en la reacción de secuencia usando el iniciador interno se obtiene un fragmento de 183 pb, conteniendo este, el cambio más importante en el Gen M donde se puede comprobar si confiere o no resistencia a los adamantanos.

Gen 7 (M) 1027 pb

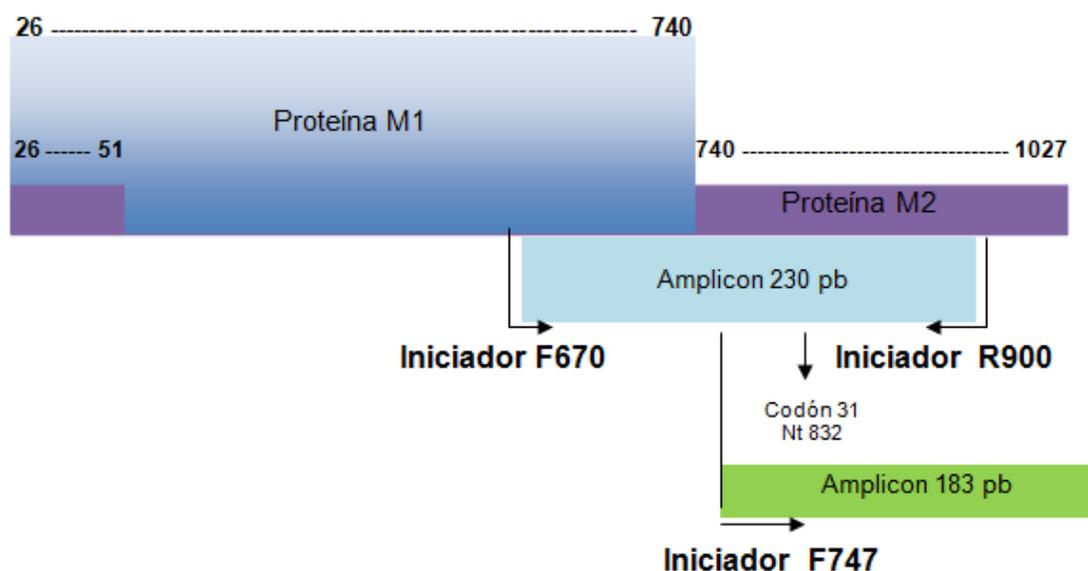


Figura 10: Mapa de iniciadores F670, R900 y F747.

El método de RT-PCR da como resultado fragmentos de DNA duplicados de forma logarítmica, estos fragmentos que pertenecen al gen M que conforma la matriz 2 del virus de la influenza, contienen el sitio donde está el cambio de A por G (Varough, 2010) que confiere la resistencia a los adamantanos (S31N). El fragmento obtenido en la RT-PCR tiene un tamaño de 230 pb, se verifica y cuantifica en un DNChip como se muestra en la figura 11. Se realizó la reacción de secuencia y lectura de las muestras por electroforesis capilar (<http://www.iib.uam.es/servicios/seq/otros/SecuenciaDNA/sanger, 2006>).

Después de tener un protocolo de PCR optimizado se analizaron con estas condiciones 23 aislamientos virales de influenza A H1N1 pandémica, los cuales previamente fueron determinados fenotípicamente como resistentes a los adamantanos. (Estudio realizado por CDC de Atlanta). En todas estas muestras se observó la presencia de la mutación S31N, lo cual indica que nuestro método es útil para determinar la presencia de la mutación que confiere resistencia a estos antivirales.



Figura 11: Imagen digital de gel donde se muestran productos de PCR con un tamaño de 230 pb, correspondientes al gen de la matriz 2 del virus de la influenza A H1N1 pandémica.

Al cuantificar las muestras en un bioanalizador, la sensibilidad del equipo permitió ver la calidad con la que se trabajó durante la RT-PCR ya que hubo muestras con una concentración de DNA menores a $1\text{ ng}/\mu\text{L}$.

En el proceso de purificación de la reacción de secuenciación se observó que no existe diferencia entre los dos métodos usados (columnas y placa de purificación), se utilizó una placa de purificación cuando había un número mayor a 16 muestras con el fin de ahorrar tiempo sin disminuir la calidad de las secuencias obtenidas.

El módulo usado en la electroforesis capilar, corresponde a la química 3.1v usando un polímero tipo POP 7 y un tiempo de aproximadamente 60 minutos por corrida de 16 capilares.

Al realizar la lectura de las secuencias se comprobó la sensibilidad del equipo de electroforesis capilar automatizada, ya que dentro de las muestras que se secuenciaron, algunas no

cumplían con la concentración de DNA mínima requerida, sin embargo el equipo ofreció secuencias positivas y editables. Después de tener el proceso de secuenciación optimizado, se realizó la búsqueda de la mutación S31N en un total de 90 muestras (cultivos, biospías e hisopodos), las cuales se analizaron por medio de los softwares: Sequencing Analysis, Chromas (Figura 12), Clustal X, BioEdit y el BLAST de NCBI.

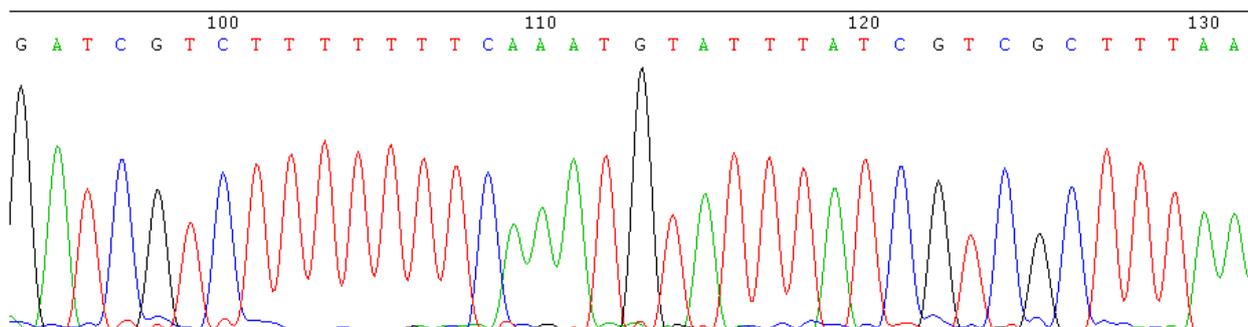


Figura 12: Electroferograma visualizado en el programa Chromas, el cual muestra el fragmento de secuencia obtenida usando los iniciadores F650 y R900.

Una vez obtenidas todas las secuencias (113 totales), los resultados obtenidos de estas secuencias se interpretaron observando el cambio en el codón que codifica para el aminoácido 31, donde la guanina (G) cambia por una adenina (A) lo cual provoca que la cepa sea resistente a los adamantanos en un 100% de las muestras de influenza H1N1 pandémica.

Estos cambios como se menciona anteriormente son provocados por mutaciones puntuales, las cuales causan un cambio en la expresión de la proteína a través de la variación antigénica por reorganización y fallos en la transcripción del RNA (<http://www.paginadigital.org/articulos/2005/2005terc/tecnologia5/virus-gripe-221005.asp>, 2005) (<http://pathmicro.med.sc.edu/Spanish-Virology/spanish-chapter13.htm>, 2008).

Dentro de las muestras secuenciadas se incluyeron cuatro identificadas como influenza A H1N1 estacional. Estas muestras no presentan la mutación S31N y son sensibles a los adamantanos, Por lo tanto podemos observar comparativamente la diferencia entre una cepa sensible (H1N1 estacional) y una cepa resistente (H1N1 pandémica). Estas muestras fueron tratadas exactamente igual que las muestras de Influenza A H1N1 pandémicas. Se usaron los

mismos protocolos desde la extracción de RNA hasta la reacción de secuencia y posteriormente la edición y obtención de los resultados (Figura 13).

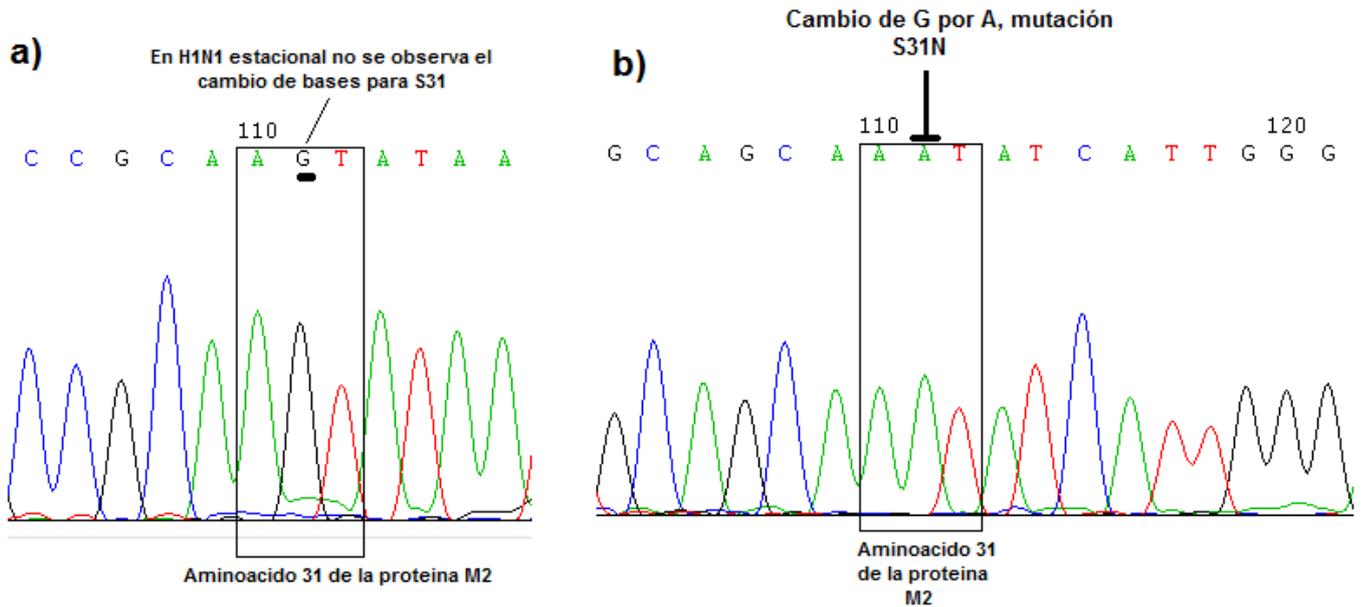


Figura 13: Electroferogramas visualizados en el programa Chromas. a) Secuencia donde no está presente la mutación S31N, b) Secuencia con el cambio de bases que provoca la mutación S31N.

En la figura 14 se muestran las secuencias de influenza A H1N1 pandémica e influenza A H1N1 estacional en una alineación hecha utilizando el software Clustal X, observando de manera gráfica las diferencias entre los dos tipos de virus, también se muestra en ambas cepas, el codón 31 donde se encuentra el cambio de nucleótidos que provoca la mutación S31N para conferir resistencia a los adamantanos.

Codón 31

```
33--3733 ed CCTACCAGAAGCGAATGGGAGTGCAGATGCAGCGATTCAAGTGATCCTCTCGTCATTGCAGCAAAATATCATTGGGATCTTGCACCTGA
34--28494 ed CCTATCAGAAACGAATGGGGGTGCAGATGCAACGATTCAAGTGATCCTCTTGTGTTGCCGCAAGTATAAATTGGGATTGTGCACTTGA
35--624 ed CCTATCAGAAACGAATGGGGGTGCAGATGCAACGATTCAAGTGATCCTCTTGTGTTGCCGCAAGTATAAATTGGGATTGTGCACTTGA
36--48090 ed CCTACCAGAAGCGAATGGGAGTGCAGATGCAGCGATTCAAGTGATCCTCTCGTCATTGCAGCAAAATATCATTGGGATCTTGCACCTGA
37--7377 ed CCTACCAGAAGCGAATGGGAGTGCAGATGCAGCGATTCAAGTGATCCTCTCGTCATTGCAGCAAAATATCATTGGGATCTTGCACCTGA
38--7427 ed CCTACCAGAAGCGAATGGGAGTGCAGATGCAGCGATTCAAGTGATCCTCTCGTCATTGCAGCAAAATATCATTGGGATCTTGCACCTGA
39--33564 ed CCTACCAGAAGCGAATGGGAGTGCAGATGCAGCGATTCAAGTGATCCTCTCGTCATTGCAGCAAAATATCATTGGGATCTTGCACCTGA
40--36529 ed CCTACCAGAAGCGAATGGGAGTGCAGATGCAGCGATTCAAGTGATCCTCTCGTCATTGCAGCAAAATATCATTGGGATCTTGCACCTGA
41--40791 ed CCTACCAGAAGCGAATGGGAGTGCAGATGCAGCGATTCAAGTGATCCTCTCGTCATTGCAGCAAAATATCATTGGGATCTTGCACCTGA
42--48792 ed CCTACCAGAAGCGAATGGGAGTGCAGATGCAGCGATTCAAGTGATCCTCTCGTCATTGCAGCAAAATATCATTGGGATCTTGCACCTGA
43--49020 ed CCTACCAGAAGCGAATGGGAGTGCAGATGCAGCGATTCAAGTGATCCTCTCGTCATTGCAGCAAAATATCATTGGGATCTTGCACCTGA
44--190 ed CCTATCAGAAACGAATGGGGGTGCAGATGCAACGATTCAAGTGATCCTCTTGTGTTGCCGCAAGTATAAATTGGGATTGTGCACTTGA
45--429 ed CCTATCAGAAACGAATGGGGGTGCAGATGCAACGATTCAAGTGATCCTCTTGTGTTGCCGCAAGTATAAATTGGGATTGTGCACTTGA
46--8508 ed CCTACCAGAAGCGAATGGGAGTGCAGATGCAGCGATTCAAGTGATCCTCTCGTCATTGCAGCAAAATATCATTGGGATCTTGCACCTGA
47--8524 ed CCTACCAGAAGCGAATGGGAGTGCAGATGCAGCGATTCAAGTGATCCTCTCGTCATTGCAGCAAAATATCATTGGGATCTTGCACCTGA
48--8529 ed CCTACCAGAAGCGGATGGGAGTGCAGATGCAGCGATTCAAGTGATCCTCTCGTCATTGCAGCAAAATATCATTGGGATCTTGCACCTGA
```

Figura 14: Alineamiento múltiple visualizado en el programa Clustal X donde se observan las diferencias entre influenza A H1N1 pandémica y H1N1 estacional (Subrayadas con rojo).

En la actualidad circulan virus de la influenza A H1N1 pandémica con triples recombinantes donde se han encontrado otros marcadores de la resistencia a los adamantanos. Los marcadores antes mencionados son: L26F, V27A, A30V, A30T, S31N y G34E (Varough, 2010).

Para analizar estos marcadores se hizo un alineamiento de todas las secuencias perfectamente editadas y se usa una secuencia de referencia la cual pertenece al gen de la matriz 2 obtenida del NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, 2010).

Se hizo un alineamiento de la secuencia de referencia junto con las otras secuencias pertenecientes al total de las muestras hasta obtener un marco de lectura correcto. Al hacer la traducción se observa perfectamente el cambio S31N y ausencia de los otros marcadores de resistencia (Figura 15).

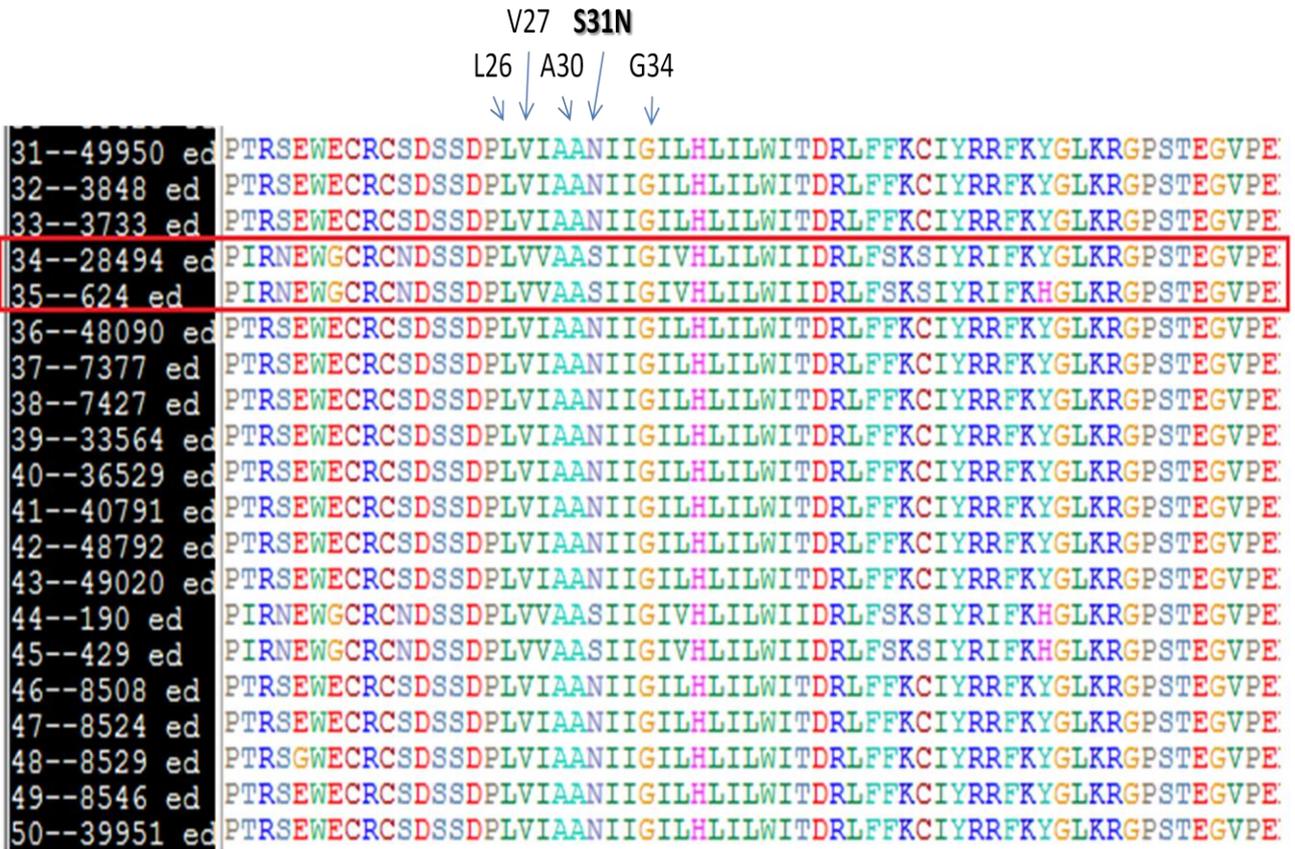


Figura 15. Traducción de nucleótidos en aminoácidos realizado en el programa BioEdit. En el rectángulo rojo se encuentran las muestras de influenza A H1N1 estacional. Los marcadores L26, V27, A30, y G34 no presentan ninguna sustitución. Se observa la mutación S31N que confiere resistencia antiviral.

También se pueden analizar los marcadores de resistencia por medio de una herramienta bioinformática exclusiva para el virus de la influenza llamada BII FluSurver (<http://flusurver.inmegen.gob.mx>, 2010) en la cual se ingresa la secuencia en formato fasta o texto y se indica contra qué tipo de influenza se quiere que la compare y analice, la aplicación automáticamente indica el porcentaje de cobertura, la identidad y los cambios que producen mutaciones en el gen de la proteína, así también dice si estos cambios confieren resistencia a fármacos.

Los resultados obtenidos después de un análisis con BII FluSurver de las muestras de Influenza A H1N1 pandémicas, indica que presentan la mutación más importante para la resistencia a adamantanos (S31N), pero también muestran otro cambio el cual es un marcador de resistencia a los adamantanos reportado en el año de 2004 en Estados Unidos, se trata del

marcador G16E, en donde se da el cambio de una Adenina por una Guanina (Schmidtke, 2006).

En la figura 16 se muestran los cambios S31N y G16E, el otro marcador de resistencia a los adamantanos.



Figura 16: Alineamiento múltiple realizado en el programa BioEdit donde se traduce la secuencia a aminoácidos, se observa el cambio G16E y S31N marcados con color rojo.

En este mismo análisis con el FluSurver, se detectaron 7 secuencias que mostraron cambios diferentes a los marcadores S31N y G16E. En la figura 17 se muestra una alineación de la secuencia consenso que es idéntica a 73 secuencias y las 7 secuencias que muestran un cambio en la proteína.

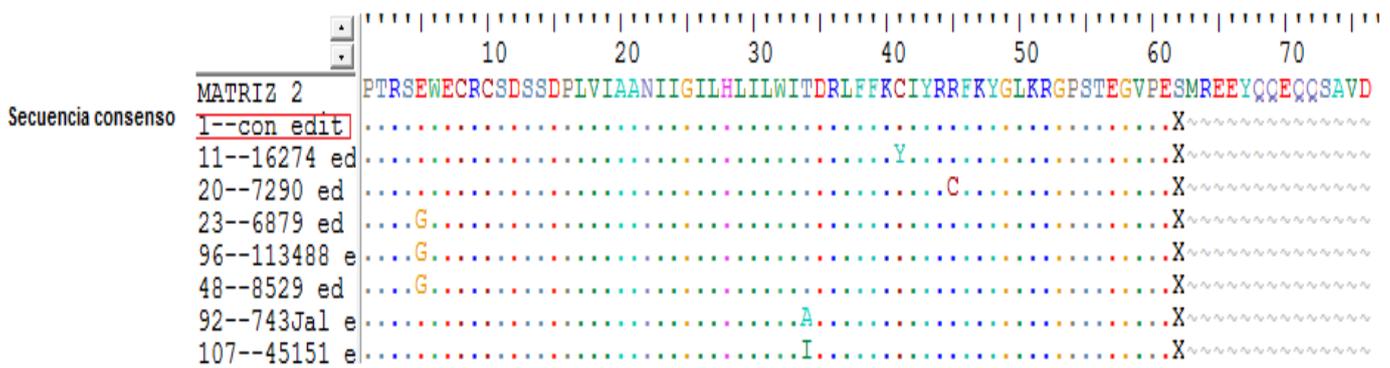


Figura 17: Alineamiento múltiple realizado en el programa BioEdit donde se muestran secuencias que presentan cambios diferentes a los marcadores de resistencia.

En la siguiente tabla se presentan las sustituciones encontradas en las 7 muestras analizadas.

Tabla 4: Muestras donde se observaron mutaciones expresadas en la proteína M2.

Muestra	Cambio
16274	C50Y
7290	R54C
6879, 8529, 113488	E14G
743Jal	T43A
45151	T43I

La mutación C50Y en M2 se encontró en Octubre del 2009 en la cepa (A/Ontario/309862/2009 (H1N1)) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, 2010) (<http://fluserver.inmegen.gob.mx>, 2010).

La mutación R54C es nueva y no se encuentra actualmente en la base de datos del GeneBank (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, 2010) (<http://fluserver.inmegen.gob.mx>, 2010).

La mutación E14G fue registrada en el Gene Bank, en Julio del 2009 se encontró en México al analizar la cepa A/Mexicocity/CIA2/2009(H1N1).

Las mutaciones R54C, T43A y T43I son nuevas y no se encuentran actualmente en la base de datos del GeneBank (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, 2010) (<http://fluserver.inmegen.gob.mx>, 2010).

Al investigar sobre estas mutaciones se encontró que aun no hay publicación sobre estos cambios y no alteran el comportamiento del virus, ni dan algún tipo de resistencia a los antivirales por lo que es conveniente hacer estudios posteriores sobre el origen y repercusiones de estas alteraciones en la secuencia del virus, ya que estas se expresan en la traducción de la proteína.

La mutación S31N y G16E se encontró en el 100% de las muestras de influenza A H1N1 pandémica, comprobando que todos los pacientes infectados con esta cepa no reaccionarían favorablemente al tratamiento con amantadina y rimantadina y en este caso es necesario un medicamento alternativo como el oseltamivir o zanamivir.

Finalmente se comprobó que el método molecular propuesto en este trabajo es eficaz para detectar la mutación S31N que confiere resistencia a los adamantanos siguiendo un procedimiento de extracción, amplificación, cuantificación, secuencia y análisis, donde en un tiempo de 12 horas es posible obtener datos moleculares que sirven para referencia de la cepa.

Capítulo V

Conclusiones

Se detectó la mutación S31N que confiere resistencia a los adamantanos por medio de un método molecular el cual pudo ofrecer un diagnóstico rápido y preciso a pacientes infectados con el virus.

Se obtuvo RNA viral correspondiente al virus de la Influenza A H1N1 pandémica a partir de cultivo celular y muestras biológicas de pacientes infectados para evaluar la eficacia del método.

Se realizó una estandarización y optimización de una técnica de RT-PCR y secuencia de DNA para detectar marcadores moleculares tales como S31N y G16E los cuales confieren resistencia a adamantanos en virus de influenza A H1N1 pandémica.

Se analizaron los datos moleculares de la secuencia del material genético obtenido por medio de herramientas bioinformáticas para confirmar o descartar cepas sensibles y/o resistentes.

Es importante mencionar que la tecnología que se utiliza en la biología molecular brindó una respuesta rápida necesaria para conocer al virus y tomar decisiones para el tratamiento de pacientes con cepas resistentes.

Referencias

Agilent. 2008. <http://www.biosanalytique.com/clients/www.biosanalytique.com/documents/docs/Instruments/Bioanalyzer-2100-ES.pdf>

Aguilar, A. y Tesoro Cruz, E. 2000. Fin de milenio. Los virus, nuevos invasores. Revista Ciencia y Desarrollo **XXVI** (155): 13-15.

Arias, C. y López, S. 2009. Anatomía del virus de la influenza A/H1N1-2009. Ciencia: 14-21.

Ayora-Talavera, G. 1999. Influenza: Historia de una enfermedad. Biomédicas **X** (1): 57-61.

Barrera, S. Rojas, M. y Ortiz, L. 1993. Reacción en cadena de la polimerasa. Revista Ciencia y Desarrollo: 51-65.

Bartlett-Stirling, S. 2003. A Short History of the Polymerase Chain Reaction. Methods Molecular Biology **CCXXVI**: 3-6.

Bouvier, N. y Palese, P. 2008. The biology of influenza viruses. Journal of Virology **XII**: 26.

Cytos. 2006. Biotechnology AG. M2 Influenza. Vaccine. <http://www.cytos.com>. 2011.

Chunlong, M. y Polishch, A. 2009. Identification of the functional core of the influenza A virus A/M2 proton-selective ion channel. Proceedings of the National Academy of Sciences **CVI** (30): 12283-12288.

Cisternaab, R. y Basarasba, M. 2002. Patogenia del virus gripal en el tracto Respiratorio. Vacunas. **III**: 5-8

Furuse, Y. y Suzuk, A. 2009. Evolution of the M gene of the influenza A virus in different host species: large-scale sequence analysis. The Journal of Biological Chemistry **VI**: 67.

Henkel, J. R. y Weisz, O. A. 1998. Differential Sorting and Golgi Export Requirements for Raft-associated and Raft-independent Apical Proteins along the Biosynthetic Pathway. *The Journal of Biological Chemistry* **CCLXXIII** (11): 6518–6524.

<http://1.bp.blogspot.com/.../s1600/influenza>, 2009

<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, 2010

http://dialogica.com.ar/.../archives/Esquema_de_PCR, 2006

<http://flusurver.inmegen.gob.mx>, 2010

<http://knol.google.co.kr>, 2009

<http://pathmicro.med.sc.edu/Spanish-Virology/spanish-chapter13.htm>, 2008

<http://portal.salud.gob.mx/contenidos/noticias/influenza>, 2009

Isselbacher, K. J. Adams, P. Kurt, J. Joseph B. Jean, D. y Braunwald, E. 1994. "Harrison. Principios de Medicina Interna". Ed. McGraw-Hill Interamericana. Madrid, España, p84-488

Luchsinger, V. 2009. Características del virus influenza y diagnóstico de laboratorio, Programa de Virología. Facultad de Medicina. Universidad de Chile: 3-5, www.neumologia-pediatria.cl

Luque, J. Herraiz, A. 2001. <http://www.ucm.es/info/genetica/AVG/practicas/secuencia>, 2009.

Njafov, A. 2008. PCR Guru. A benchtop reference for molecular Biologists. Libro digital PDF, p6-8, 16-18, 32-34

Reiko, S. H. Oshitani, H. y Hiroshi, S. 2002. Detection of Amantadine-Resistant Influenza A Virus Strains in Nursing Homes by PCR Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis with Nasopharyngeal Swabs. *Journal of Clinical Microbiology* **I**: 84–88.

Rubin, M.S. Nivin, B. y Ackelsberg, J. 2008. Effect of Timing of Amantadine Chemoprophylaxis on Severity of Outbreaks of Influenza A in Adult Long-Term Care Facilities. *Clinical Infectious Diseases* **XLVII**: 47-52.

Sambrook, J. y Russel, D. W. 2001. "Molecular Cloning: A Laboratory Manual". Ed. CSHL Press, Nueva York, Estados Unidos, p 223-229

Sarmiento, R. E. 2009. <http://www.facmed.unam.mx/deptos/salud/periodico/influenza/patogenia>

Santos-Burgoa, C. 2009. http://promocion.salud.gob.mx/dgps/descargas1/influenza/mat/Influenza_Info_General_Oct_2009.pdf

Schmidtke, M. 2006. Amantadine Resistance among Porcine H1N1, H1N2, and H3N2 Influenza A Viruses Isolated in Germany between 1981 and 2001. *Intervirology* **XLIX**: 286–293.

Treanor, J. J. Hayden, F.G. y Vrooman P.S. 2000. Efficacy and safety of the oral neuraminidase Inhibitor oseltamivir in treating acute influenza. A randomized controlled trial. *The Journal of the American Medical Association* **CCLXXXVIII**: 1016-1024.

Varough, M. Deyde, T. G. y Sheu,, A. 2010. Detection of Molecular Markers of Drug Resistance in 2009 Pandemic Influenza A (H1N1) Viruses by Pyrosequencing. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **LIV** (3): 1102–1110.

Watson, J. D, Baker, T. A, Bell, S. P, Gann, A. y Levine M. 2004. "Molecular Biology of the Gene". Ed. Pearson, Nueva York, Estados Unidos, p. 234-245.

WHO, 2009, http://www.who.int/csr/resources/publications/swineflu/M2_DetailedPyrosequencing_20090513.pdf

www.bioteconologiaaldia.es/ES/index, 2009

www.garrahan.gov.ar/cime/boletines/amanrim.htm, 2009

www.iib.uam.es/servicios/seq/otros/SecuenciaDNA/sanger, 2006

www.losarchivosdelatierra.com/storage/fotos, 2009

www.mednet.cl/.../cursos/1, Medwave. Año IX, No. 6, Junio 2009

www.paginadigital.org/articulos/2005/2005terc/tecnologia5/virus-gripe-221005.asp, 2005

www.saludycomunicacion.com/.../2008/03/gripe.gif

www.who.int/csr/disease/swineflu/en/, 2010

Yocupicio, M. y Zárate, S. 2008. Conozcamos el virus de la influenza. Publicación del Posgrado en Ciencias Genómicas UACM, <http://www.uacm.edu.mx/SitioGenomicas/publi.html>. 2011