



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA**

**“DESARROLLO DE UN MÉTODO PARA LA DETECCIÓN
DE LOS MARCADORES MOLECULARES Q136, K150 Y D151
QUE CONFIEREN RESISTENCIA A ZANAMIVIR EN EL
GEN DE LA NEURAMINIDASA DEL VIRUS DE LA
INFLUENZA A(H1N1) PANDÉMICA”**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A:

JOSÉ MIGUEL SEGURA CANDELAS

Dr. José Ernesto Ramírez González
Director

Dra. Elia Roldán Reyes
Asesor Interno

México, D.F., marzo de 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.

Después de todo, cuando estás enamorado, quieres contarlo a todo el mundo. Por eso, la idea de que los científicos no hablen al público de la ciencia me parece aberrante.

Carl Sagan

A mi madre,
gracias, por darme la vida,
por guiar cada uno de mis pasos,
por tu amor, confianza y protección.
TE AMO.

A mis abuelos,
Ma. Ascensión y Jacinto,
por ser la semilla de la grandiosa familia
a la cuál pertenezco.

AGRADECIMIENTOS

A mi casa de estudios, la Universidad Nacional Autónoma de México, por las facilidades otorgadas a lo largo de mi carrera para la culminación de mis estudios.

A mis padres, Esther y Rogelio, por estar conmigo a lo largo de todo este tiempo, gracias por su comprensión y apoyo. A mis hermanas, Jaqueline y Nayibi, que mis pasos sirvan de ejemplo para guiar los suyos, siempre estaré con ustedes, las quiero.

A mi abue, Ma. Ascensión, por darme a la mejor madre del mundo, por darme tanto, quererme y cuidarme, te amo abuelita. A la memoria de mi abuelo Jacinto, donde estés, gracias por todo.

A mi director de tesis, Dr. José Ernesto Ramírez Gonzales, por guiarme a lo largo de este proyecto, darme un lugar en su equipo de trabajo, ser parte importante de mi formación profesional, brindarme su amistad y enseñarme tanto. Espero aprender mucho más de usted.

A mi tutora y asesora, Dra. Elia Roldán Reyes, por estar conmigo durante toda mi carrera, por ser parte importante de mi quehacer profesional, brindarme su apoyo, confianza y amistad, así como por el tiempo dedicado a este trabajo.

A mis amigos de toda la vida, Ofelia Rios, Ana Manterola y Daniel Andrade, por hacerme una mejor persona cada día, gracias por abrirme las puertas de su corazón, por tantos momentos juntos, por estar conmigo en las buenas y en las malas, por enseñarme tanto. A ustedes y a cada una de sus hermosas familias, muchas gracias. Los quiero mueganitos!!!!!!

A Diego Ernesto Villanueva y Yolanda Santiago, por enseñarme tanto, brindarme su amistad, y formar parte de una de las etapas más felices en mi vida. Estoy en deuda con ustedes.

A Patricia Alcántara, gracias por tantos consejos que hoy forman parte de mi vida, hoy soy una mejor persona gracias a ti. Por tus enseñanzas, por tu amistad y confianza puestas en mí. Por tu apoyo en este trabajo. Estas en mi corazón Paty.

A los Pingüinos, Brisia Rodríguez, Jesús Zavala y Clara Martínez, por su apoyo en este trabajo, su amistad y hacerme pasar muchos momentos felices.

A todo el personal del laboratorio de Genoma de Patógenos del InDRE, Faby, Ara, Lidia, Juan Carlos, Abril, Aida, Ely, Joanna, Hugo, Susy, Claudia, Amíne y Luisa. Gracias por su apoyo en la realización de este trabajo.

A Isaura Martínez, por su valioso apoyo durante mi investigación. Gracias Isa.

A mi familia Limantour, Ricardo, Miguel, Lety, Ernesto, Bere, Mariana, Marina, Edith, Tania, Mónica, Paulina, Fabiola, Héctor, Jessica y Julio por adoptarme y hacerme pasar momentos memorables y felices. Los quiero.

A las “Cerebridades” y amigos de Universum, Paola Andrea, Oscar, Maribel, Idalia, Araceli, Sandra, Lorena, Ale M. Ale O, Karen, Mayra, Elí, Sebas, Karlita, Octavio, Yarummy, Jaret, Paola Eunice, Jhon, Richter, Diana, Eligio, Fabiola, Jessica, Germán, Odette y Luisa. Gracias por formar parte de una de las etapas más felices de mi vida. Si no me da Alzheimer, siempre los recordaré.

A todas aquellas personas que de una forma u otra, me han apoyado hasta el día de hoy. Gracias.

Mike.

ÍNDICE

1. Resumen.....	2
2. Introducción.....	3
3. Marco Teórico.....	5
3.1. Historia de la Influenza.....	5
3.2. El virus de la Influenza.....	8
3.3. Mutaciones.....	11
3.4. Origen de la variabilidad genética del virus de la Influenza.....	12
3.5. Antivirales para el tratamiento de la Influenza.....	14
3.6. Neuraminidasa.....	15
3.7. Zanamivir.....	17
3.8. Resistencia antiviral del virus de la Influenza.....	18
3.9. RT-PCR.....	21
3.10. Secuenciación.....	25
4. Justificación.....	28
5. Hipótesis.....	29
6. Objetivos.....	29
7. Material y Método.....	30
8. Resultados y Discusión.....	38
9. Conclusiones.....	54
10. Referencias Bibliográficas.....	55

1. RESUMEN

El presente trabajo se basó en el desarrollo de un método para la detección de los marcadores moleculares Q136, K150 y D151 en el gen de la Neuraminidasa del virus de la Influenza A(H1N1) pandémica, donde variaciones en estos marcadores están asociadas con la resistencia a zanamivir.

Se realizaron extracciones de RNA a partir de cultivos celulares, hisopos nasofaríngeos y biopsias, previamente determinadas como positivas para el virus de la Influenza A(H1N1) pandémica, para después ser amplificadas por la técnica de RT-PCR usando iniciadores específicos para la región de interés en el gen de la Neuraminidasa.

Se obtuvo la secuencia nucleotídica del amplicón mediante la técnica de secuenciación capilar y se analizó utilizando programas bioinformáticos (Chromas, BLASTn, Clustal X y BioEdit) para la detección de posibles mutaciones en los marcadores de interés

Después del análisis bioinformático, no se encontraron mutaciones en los marcadores que confieren resistencia a zanamivir, sin embargo fue posible identificar mutaciones en otras posiciones del amplicón generado (V116I, R220K, I211M, A232V).

Finalmente, se logró establecer un método para la detección de los marcadores moleculares antes mencionados mediante RT-PCR/secuenciación capilar en muestras de diferente origen, con el propósito de identificar cepas con posible resistencia a Zanamivir en la población.

2. INTRODUCCIÓN

En la primavera de 2009, un virus de influenza A(H1N1) antigénicamente nuevo se detectó en América del Norte. La rápida transmisión generalizada del virus resultó en la declaración de una pandemia de gripe por la Organización Mundial de la Salud (OMS). El virus de la gripe A(H1N1) pandémica del año 2009 resultó ser un reagrupado con una combinación de segmentos de genes que no habían sido previamente descritos. El análisis filogenético de las secuencias del genoma completo reveló que en la década de 1990, se produjo una redistribución entre un virus de la influenza estacional (H3N2), el virus clásico de influenza porcina, y el virus de la gripe aviar de Norte América, esto llevó a la aparición de la reagrupación triple de los virus H3N2 y H1N2 de la gripe, que desde entonces han circulado en los cerdos de Norte América. El virus de la pandemia fue el resultado de una redistribución más entre esta reagrupación del virus de la influenza porcina y el virus de la influenza aviar de Europa y Asia, similar al virus de la influenza porcina, que resulta en la adquisición de dos segmentos de genes que codifican para la proteína M y la Neuraminidasa (NA) (Fig. 1) (Deyde *et al.*, 2010).

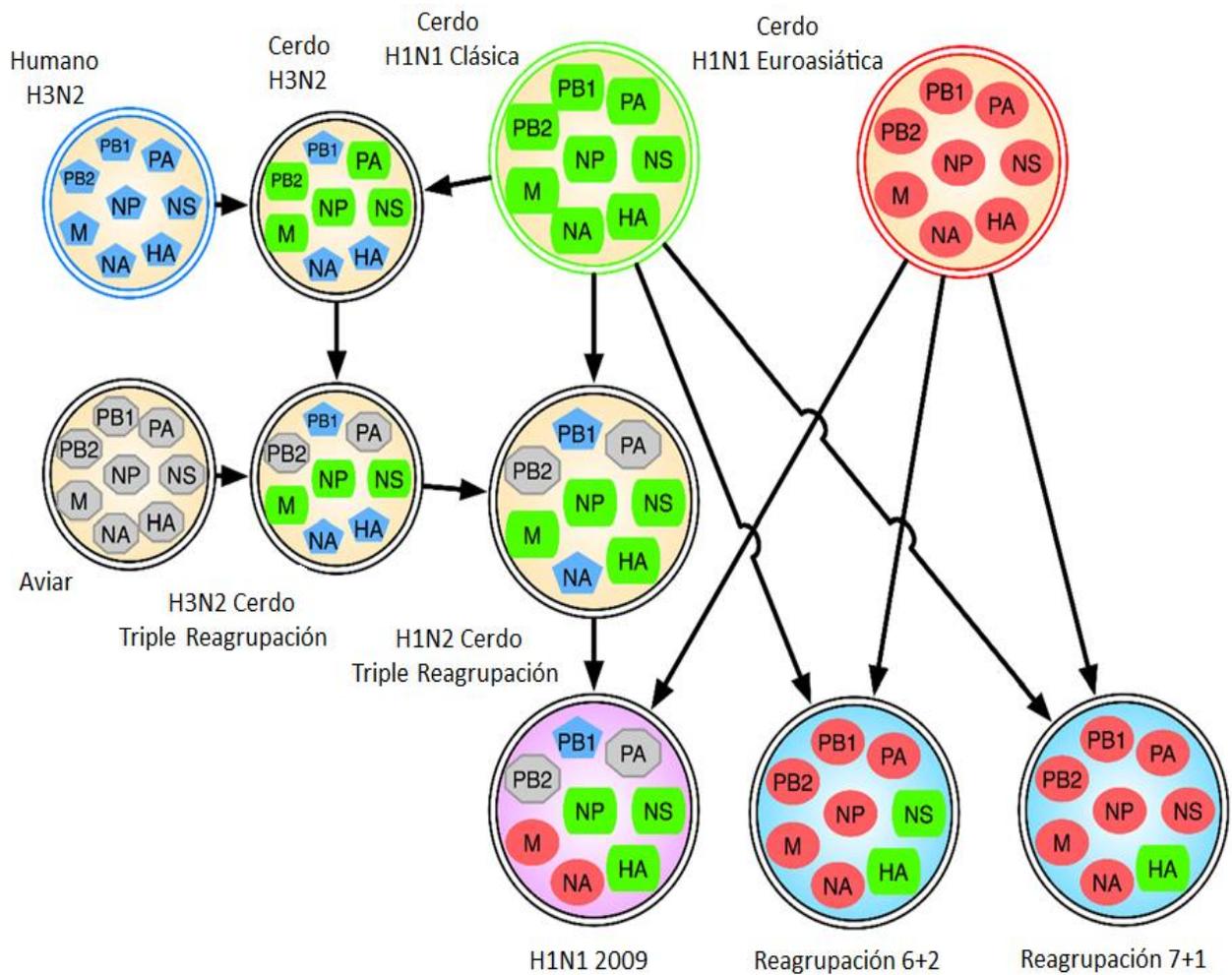


Figura 1: Origen de la organización genotípica del virus de la Influenza A(H1N1) pdm (las líneas curvas indican no intersección con las líneas rectas) (Kingsford, 2009).

3. MARCO TEÓRICO

3.1 Historia de la Influenza

En los pasados 400 años, las epidemias de influenza han sido reportadas en muchos países. Las epidemias desde el siglo XVI en Inglaterra y la del siglo XVIII en USA, son reconocidas como influenza, aun con la ausencia del conocimiento preciso del agente causal. La pandemia de influenza de 1918 fue la más grande en la historia actual, causando 20 millones de muertes en todo el mundo. En los tiempos modernos desde 1957 y 1968 las pandemias de influenza han matado cerca de un millón de personas. La relación entre el cambio antigénico y epidemia es algo complejo, involucra numerosos factores atribuibles al huésped y a los virus.

La altamente contagiosa enfermedad respiratoria aguda conocida ahora como influenza, parece que ha afectado a los humanos desde los tiempos antiguos. La súbita aparición de enfermedades respiratorias que persisten por pocas semanas e igualmente desaparecen, 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.

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*.

La primera pandemia que mejor se recuerda ocurrió en 1580 y se creó, se originó en Asia; de ahí se dispersó a África y Europa. La mortalidad fue alta en algunas ciudades e indudablemente fue altamente incrementada por la práctica de sangrar al enfermo para reducir la fiebre. Durante los siguientes tres siglos, a pesar de que el seguimiento fue irregular y no muy preciso, hubo un número definido de pandemias (junto con las epidemias intermedias), en las que los historiadores están de acuerdo.

La investigación retrospectiva en la década pasada ha aclarado parcialmente la naturaleza de la pandemia de 1889 al probar anticuerpos para influenza en el suero de gente que vivió en ese tiempo. Sin embargo, no fue sino hasta 1930 que un virus específico fue identificado como la causa de influenza, siendo el comienzo de un mejor entendimiento de la enfermedad. En términos de números de las víctimas humanas, la gran pandemia de 1918-19 fue sin precedentes. Estimaciones van de un mínimo de 20 millones de muertes en todo el mundo hasta más del doble de este número.

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 substituyó 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 substituyó al virus H2N2 que circuló entre 1957 y 1968.

Técnicas seroarqueológicas, probando los anticuerpos de gente que vivió durante estas epidemias, 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. Hace 43 años ocurrió la penúltima pandemia de influenza humana, la pandemia de Hong-Kong en 1968. El virus de influenza A H3N2 que fue introducido en la población humana en ese entonces, contenía una nueva Hemaglutinina, el principal antígeno de superficie. El virus de influenza A(H2N2) de la pandemia de 1957 contenía nuevas a la Hemaglutinina y la Neuraminidasa. Estudios filogenéticos revelaron 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. Sin embargo, los virus relacionados con la más devastadora pandemia de influenza, 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) con antiseros de hurones contra virus humanos y porcinos. Análisis posteriores demostraron que el subtipo de virus era influenza A(H5N1), un subtipo que no había sido previamente identificado en los seres humanos. El virus de influenza A(H5N1) cumple dos de los tres importantes criterios para un nuevo virus de influenza con carácter pandémico: la habilidad para replicarse en los seres humanos y la ausencia de anticuerpos a este virus en la población humana. El tercer criterio es el potencial de dispersarse de hombre a hombre, lo cual no ha sido observado. Aproximadamente seis meses después del primer caso

de infección humana con el subtipo H5N1, 17 casos más fueron confirmados y cinco de ellos fueron fatales.

Resultados preliminares de secuenciación demostraron que todos los genes son de origen aviar, sugiriendo transmisiones independientes múltiples de pájaros infectados a la gente. Si la transmisión entre especies ocurre en períodos de actividad de influenza humana, el mismo hombre podría funcionar como un vaso mezclador. Aunque no existe evidencia de una eficiente dispersión del virus, su detección ilustra la importancia de un intensivo sistema de vigilancia epidemiológica (Ayora, 1999).

3.2 El virus de la Influenza

Los virus de la gripe pertenecen a la familia *Orthomyxoviridae*, compuesta por tres géneros: A, B, C. La gripe humana es causada fundamentalmente por los virus de la gripe A y B, y se han descrito casos esporádicos por el virus de la gripe C. Las tres especies virales -A, B y C- son patógenas para el hombre. El A infecta, además del hombre, a cerdos, caballos, mamíferos marinos, aves de corral, y muchas especies de aves silvestres. El B sólo infecta al hombre y el C, además del hombre, en algunas ocasiones se ha aislado en cerdos (SSA, 2006).

El virus de la Influenza es poco común entre los virus de RNA, debido a que toda la transcripción y replicación del RNA tienen lugar en el núcleo de las células infectadas. Además es el único virus de RNA (sin un DNA genómico intermedio) que utiliza algún mRNA ensamblado (Brooks *et.al.*, 2008).

Morfológicamente los virus influenza son esféricos, con un tamaño de 80 a 120 nm de diámetro (Fig. 2). Contienen una envoltura lipídica en la que se insertan glicoproteínas denominadas Hemaglutininas (HA), Neuraminidasas (NA), y una proteína de membrana (M2). Al interior de la envoltura se ubica la proteína matriz (M1) que está asociada con otra proteína no estructural (NS2). El centro del virión está conformado por el genoma viral (RNA), proteínas de la nucleocápside (NP) y tres proteínas con actividad de polimerasa (PA, PB1 y PB2) (Fig. 3) (SSA, 2006).

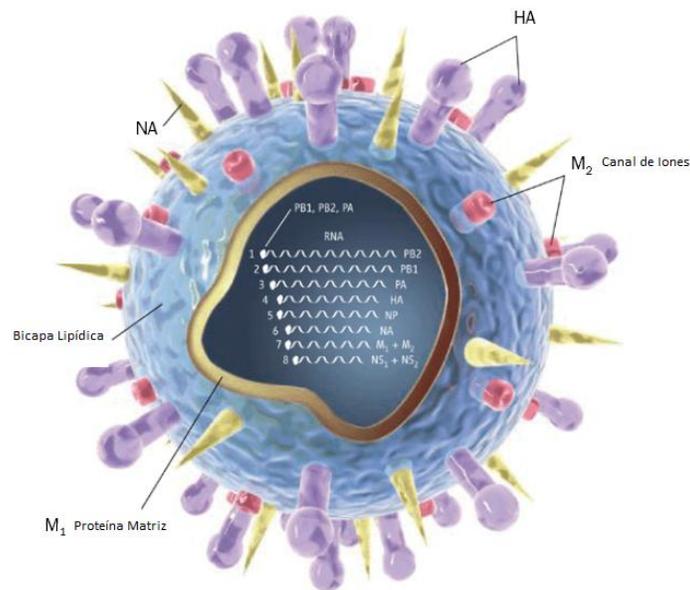


Figura 2: Diagrama estructural del virus de la Influenza. HA = Hemaglutinina; M = Matriz; NA=Neuraminidasa; NP = Nucleoproteína; NS = No estructural; PA = Polimerasa Ácida; PB= Polimerasa básica. (Sullivan, 2010)

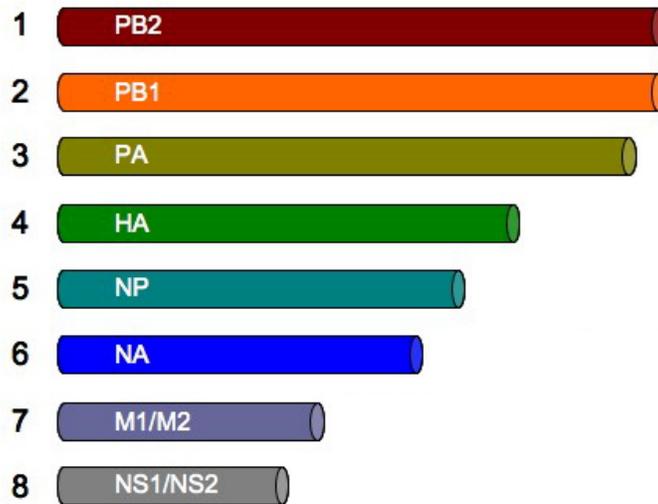


Figura 3: Esquema de los 8 genes contenidos en el material genético (RNA) del virus de la Influenza A(H1N1) pdm.

Función de cada uno de los genes en el virus de la Influenza:

- ❖ *PB2 (polimerasa básica)*: Polimeriza el RNA viral complementario (+)
- ❖ *PB1 (polimerasa básica)*: Polimeriza el RNA viral complementario (+)
- ❖ *PA (polimerasa ácida)*: Polimeriza el RNA viral (-)
- ❖ *HA (hemaglutinina)*: Promueve la adsorción viral a receptores celulares de ácido siálico.
- ❖ *NP (nucleoproteína)*: Protege el material genético viral en la célula huésped, transporta el RNA viral al núcleo y colabora con la actividad de la PA.
- ❖ *NA (neuraminidasa)*: Elimina los residuos de ácido siálico de la HA de la superficie celular favoreciendo la liberación de las partículas virales y su propagación y expansión hacia otras células (difusión-infección).
- ❖ *Proteínas de matriz*: *M1*/Promueve la interacción entre la nucleocápside y la envoltura viral. *M2*/Actúa como canal iónico de transmembrana que permite la acidificación viral necesaria para proseguir la infección intracelular

- ❖ *Proteínas no estructurales: NS1*/Inhibe la actividad antiviral inducida por el sistema interferón, al impedir el reconocimiento celular del RNA viral por el “sensor” celular RIG-1 (limitando su inducción), y al bloquear la actividad de la proteínas celulares PKR y CPSF30. *NS2*/ Regula la transcripción y replicación viral (Oubiña y Sordelli, 2009).

3.3 Mutaciones

Las mutaciones se definen como cambios en la secuencia o en el número de nucleótidos en el ácido nucleico de una célula o de un organismo. Las mutaciones de punto pueden ocurrir en forma de sustituciones de un nucleótido por otro, deleciones o adiciones de nucleótidos. Las mutaciones que ocurren en los gametos se transmiten a generaciones futuras. Las mutaciones que ocurren en las células somáticas sólo se transmiten a las células hijas que se originan por mitosis y citocinesis.

Otros cambios en la secuencia de aminoácidos de una proteína pueden ser resultado de la deleción o la adición de nucleótidos dentro de un gen. Cuando esto ocurre, el marco de lectura del gen puede desplazarse. Esto, en general, da como resultado la síntesis de una proteína completamente nueva. Los "corrimientos del marco de lectura" casi invariablemente llevan a proteínas defectuosas. (Curtis y Barnes, 2000)

3.4 Origen de la variabilidad genética del virus de la Influenza

Típicamente una RNA polimerasa viral exhibe una tasa de error de 1×10^{-3} a 1×10^{-5} , es decir, que introduce una mutación por cada mil o 100 mil nucleótidos copiados. Los virus de la influenza tipo A muestran el mayor número de mutaciones acumuladas a través del tiempo (deriva antigénica), mientras los genomas de los virus de la influenza C tienen poca variabilidad, incluso si se han aislado con décadas de separación.

Por otro lado, los genes de los virus de la influenza A se encuentran codificados en segmentos separados. Este arreglo genómico permite que los virus puedan intercambiar segmentos completos (cambios antigénicos) con otras variantes virales y generar nuevas entidades. Algunos de estos virus tendrán la capacidad de infectar humanos y en ocasiones mediante eventos mutagénicos podrán adaptarse a ser transmitidos directamente entre ellos. Esto más que ser un evento raro ocurre con frecuencia en la naturaleza y es tal vez el principal origen de cepas con potencial pandémico.

Los cerdos han sido considerados por mucho tiempo el intermediario más importante y la fuente principal de nuevas variantes de virus de la influenza. Sin embargo, en años recientes hemos aprendido que hay variantes que pueden ser transmitidas directamente por las aves, tal fue el caso del virus H5N1 que causó importantes brotes epidémicos en 2003 en Asia. De hecho, se cree que éste es el primer paso de un virus zoonótico antes de que adquiera la capacidad de ser transmitido de humano a humano. La transmisión directa del virus de la influenza porcina a humanos fue documentada por primera vez en Wisconsin en 1976. Las células susceptibles en los cerdos tienen receptores a los cuales se unen tanto los virus de la influenza de mamíferos como los de las aves, en consecuencia en sus células se produce una

reasociación de segmentos y la emergencia de nuevas variantes. Lo anterior es particularmente relevante si consideramos que la influenza es una zoonosis en esta especie. La reasociación de segmentos permite a un virus que infecta cerdos o aves, por ejemplo, obtener un segmento de un virus que proviene de humanos. Por esta razón, los cerdos son considerados los “vasos mezcladores” y la principal fuente de generación de nuevos virus de la influenza con potencial pandémico. La coinfección es un evento natural y se han confirmado dobles infecciones por H9N2 aviar y H3N2 humano en cerdos en el sureste de China. La reasociación de los segmentos codificantes para HA y NA permite la aparición de nuevos subtipos virales. A la fecha no se han descrito con detalle los mecanismos moleculares que intervienen en la reasociación de segmentos. Sin embargo, estudios de coinfección realizados con un virus humano H3N2 que circuló en Nueva York entre 1995 y 2006 y un virus H3N2 que causó brotes en Nueva Zelanda entre 2000 y 2005 indican que estos eventos pudieran no suceder al azar, lo cual limita el número de reasociaciones funcionales posibles; de no ser así cada vez que dos virus de la influenza coincidieran se generaría un mayor número de variantes virales a las observadas.

No solo en los virus de la influenza tipo A sino también en los tipos B y C se pueden llevar a cabo reasociaciones *in vivo*, sin embargo éstas deben ocurrir únicamente entre miembros del mismo tipo viral, no entre diferentes tipos. Las reasociaciones son epidemiológicamente importantes porque permiten grandes cambios en términos de la antigenicidad de las proteínas que componen al virión. Adicionalmente a las reasociaciones de segmentos ya mencionadas, los RNA virales también tienden a acumular mutaciones puntuales. Como consecuencia, la cubierta antigénica cambia y la respuesta inmune de las células B de memoria que se diferencian a células plasmáticas productoras de anticuerpos neutralizantes contra un tipo viral

no es efectiva para otro. Ésta es la principal razón por la que la vacuna para la influenza estacional se debe preparar y aplicar cada año con los principales subtipos virales circulantes; es también la causa por la que se generan brotes periódicos y recurrentes de influenza (Salazar *et.al.*, 2010).

3.5 Antivirales para el Tratamiento de la Influenza

Las antivirales utilizados en el control de la infección por virus de influenza son los Adamantanos y los inhibidores de la Neuraminidasa (NAI's). Los Adamantanos (amantadina y rimatadina), tienen efecto sobre el canal de protones codificado por la proteína viral M2. Los Adamantanos no tienen efecto sobre los virus de influenza B, ya que estos carecen de proteína M2. Por otro lado, en los últimos años la resistencia a los Adamantanos de los virus de Influenza A se ha expandido rápidamente, limitando considerablemente su uso (Bright *et al.*, 2005; Bright *et al.*, 2006; Deyde *et al.*, 2007).

Las mutaciones del virus que pueden conferir resistencia se localizan en la NA (zanamivir y oseltamivir) o en la M2 (amantadina y rimatadina). La secuencia de estos genes puede usarse como marcador para resistencia. Dado que los sitios dónde se encuentran las mutaciones están bien caracterizados, no es necesario secuenciar todo el virus para detectar resistencia. Mutaciones en el gen de NA (H274Y) se asocian con resistencia a oseltamivir (Sheu *et al.*, 2008). Antes de la temporada 2007-2008, la prevalencia de cepas de influenza A estacional resistentes a oseltamivir fue menor al 1 %. Para la temporada 2007-2008, se encontró resistencia en el 12 % de los aislados. Es importante hacer notar que en esta temporada, la resistencia no se asoció al uso previo de inhibidores de NA (Dharan *et al.*, 2009).

La caracterización de la sensibilidad del nuevo virus de la Influenza A(H1N1) pdm (pandémica) a los antivirales ha revelado resistencia a Adamantanos y susceptibilidad a los inhibidores de la NA (Gubareva *et al.*, 2009), sin embargo, en julio del año 2009, el Centro para la protección de la Salud de Hong Kong reportó la presencia de la mutación (H274Y) que confiere resistencia a esta droga en uno de sus aislados, subsecuentemente también se ha encontrado esta mutación en Japón, Dinamarca, China, Estados Unidos de Norteamérica y México (Influenza Virus Resource, NCBI).

3.6 Neuraminidasa

La Neuraminidasa es una proteína tetramérica, en forma de hongo, anclada a la membrana viral mediante una única secuencia hidrofóbica de unos 29 aminoácidos, cerca de la N-terminal. El tratamiento de los viriones con pronasa libera una proteína de 200-kDa que contiene 4 polipéptidos idénticos y glicosilados y que tienen todas las propiedades antigénicas y enzimáticas de la Neuraminidasa unida a la membrana. Esta proteína se ha cristalizado y su estructura ha sido determinada por difracción de rayos X. La conformación tridimensional de las Neuraminidasas del virus de la influenza a partir de 2 cepas N2, 2 cepas N9 y una cepa de tipo B es ahora conocida, junto con las estructuras para una serie de anticuerpos seleccionados para estos.

La estructura muestra un patrón simétrico plegado de seis láminas β de 4 hebras antiparalelas dispuestas como las aspas de una hélice. La central y primera hebra de cada lámina es paralela al eje de la hélice y la más exterior es casi perpendicular a él, dando a cada lamina un toque característico. La hebra más exterior de una laminilla se conecta a la hebra central de la

laminilla siguiente (Fig. 4). Estos bucles conectados, en la superficie superior de la enzima con respecto a su orientación en la membrana viral, contienen muchos de los aminoácidos antigénicamente y enzimáticamente importantes.

Las 4 subunidades idénticas están organizadas con simetría circular de 4 pliegues, y el sitio activo de la enzima se encuentra en el centro de cada subunidad directamente sobre las seis hebras de cada lámina. El sitio es un bolsillo profundo, y la línea de aminoácidos que rodean las paredes de la bolsa son invariables en todas las cepas de virus de la gripe caracterizado hasta el momento. Estos sitios activos asociados, en cepas de aminoácidos invariables son de dos tipos. Algunos de ellos son funcionales en el sentido de que están en contacto directo con el sustrato envolvente, y algunos brindan sólo un marco estructural para los residuos funcionales (Colman, 1994).

Esta enzima viene codificada por el gen 6 del virus que presenta una longitud de unos 1.414 nucleótidos, lo cual determina una poliproteína de unos 453 residuos aminoácidos. La NA es una enzima (acilneuraminil-hidrolasa) que cataliza e hidroliza las uniones alfacetósido entre un ácido siálico terminal y una D-galactosa o D-galactosamina adyacentes. Las principales funciones conocidas de la NA son la eliminación de los residuos de ácido siálico de la HA y la superficie celular favoreciendo la liberación de las partículas virales y su propagación y expansión hacia otras células (difusión-infección). También participa en el transporte del virus a través de la mucina presente en el tracto respiratorio, permitiendo la llegada del virus a otras células epiteliales (expansión-infección) (Reina, 2002).

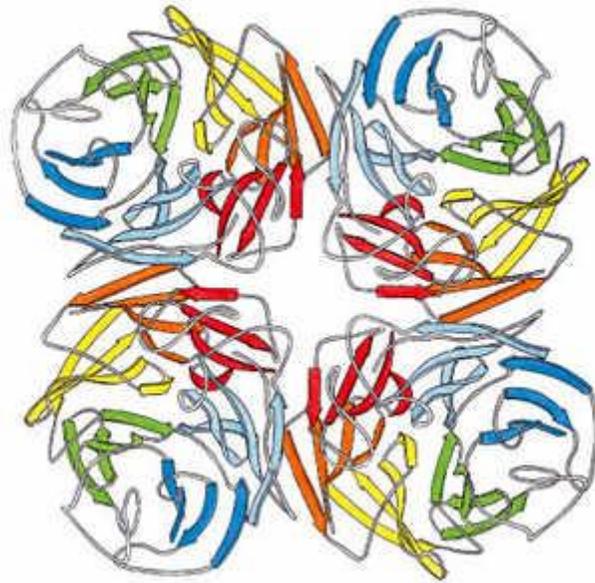


Figura 4: Estructura de la Neuraminidasa, en color se aprecian las 6 laminillas beta que la conforman. (Reina, 2002)

3.7 Zanamivir

Los NAI's, zanamivir y oseltamivir, fueron las primeras drogas que se diseñaron específicamente como agentes anti-influenza, y han estado disponibles en el mercado en muchos países desde 1999 (Hurt *et al.*, 2009).

El zanamivir fue descubierto en 1989 por un grupo de científicos dirigidos por Mark von Itzstein del Victorian College of Pharmacy, de la Universidad de Monash, en colaboración con el CSIRO (Australian Commonwealth Scientific and Research Organization). El descubrimiento fue financiado inicialmente por la compañía biotecnológica australiana Biota y fue parte del programa permanente de la misma compañía para desarrollar agentes antivirales a través del diseño racional de medicamentos. La estrategia se basó en la disponibilidad de la estructura cristalina de la Neuraminidasa de la influenza que se obtuvo por cristalografía de rayos X. Se sabía ya en 1974 que el 2-desoxi-2',3'-ácido-N-didehydro acetilneuramínico

(DANA), un análogo del ácido siálico, era un inhibidor de la Neuraminidasa (Meindl *et al.*, 1974).

La utilización de la estructura cristalina de la Neuraminidasa y el DANA como punto de partida, los investigadores emplearon un proceso asistido por computadora para tratar de diseñar una molécula que tuviera un mejor ajuste (y por tanto inhibiera) con el sitio activo de la Neuraminidasa. Zanamivir, un inhibidor análogo del estado de transición de la Neuraminidasa fue el resultado (von Itzstein *et al.*, 1994) (Fig. 5).

En 1990, la licencia de comercialización de zanamivir fue dada a GlaxoSmithKline para su comercialización en todo el mundo.

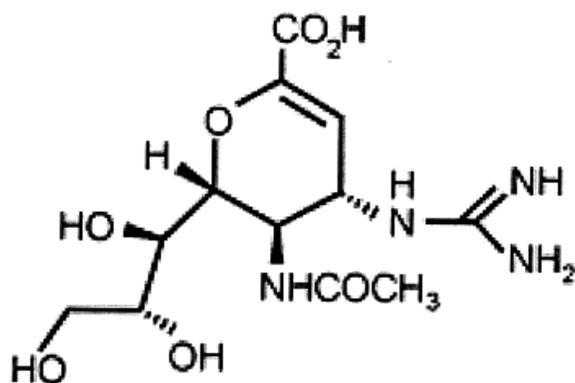


Figura 5: Estructura del zanamivir (5-acetoamido-2,6-anhidro-3,4,5-tridesoxi-4-guanidin-D-glicero-Dgalacto-nom-2-ácido enónico) (Gubareva, 2001).

3.8 Resistencia Antiviral del virus de la Influenza

Actualmente, la triple organización del virus de la gripe porcina que circula en los Estados Unidos, no contiene marcadores conocidos de resistencia a los Adamantanos (I26F, V27A, A30V, A30T, S31N, y G34E) (Hay *et al.*, 1986), mientras que el virus de la gripe aviar de

Europa y Asia, así como el virus pandémico contienen el cambio S31N en la proteína M2, el cual confiere resistencia a la adamantina.

La resistencia del virus de la Influenza A(H1N1) pdm a los Adamantanos hace al oseltamivir y al zanamivir (NAIS) las únicas opciones farmacéuticas disponibles para el control de las infecciones causadas por el virus pandémico. Muchos de los estudios que actualmente se realizan, se basan en el seguimiento de la resistencia a los NAIS, basándose en el ensayo de inhibición de la NA, esto permite la detección de la resistencia conferidos por mutaciones conocidas o nuevas. Sin embargo, el ensayo de inhibición de la NA requiere el aislamiento y la propagación del virus y la detección de la resistencia, en el ensayo de inhibición de la NA, requiere la confirmación por secuenciación de un segmento del gen NA para identificar los marcadores de resistencia y su presencia en el material clínico original.

Antes de la temporada de influenza entre el 2007 y el 2008, la frecuencia de resistencia a NAIS había sido muy baja (0,5%) en los aislamientos hechos. Durante esta temporada, surgen virus de Influenza estacional H1N1 resistentes a oseltamivir y se extienden a nivel mundial, en abril de 2009, la mayoría de las cepas del virus H1N1 fueron resistentes a oseltamivir (99.6%), pero sensibles a zanamivir. Sin embargo, casi la totalidad de los virus de la Influenza A(H1N1) de la pandemia del año 2009 fueron sensibles a los NAIS (CDC, 2009), sólo casos esporádicos de los virus resistentes a oseltamivir con la mutación H275Y en el gen NA se comunicaron a la OMS.

Los informes recientes de la aparición de virus resistentes a oseltamivir, muestran la necesidad de realizar un estrecho seguimiento de la susceptibilidad del virus pandémico H1N1 a los

fármacos disponibles. Dicha información es necesaria para tomar decisiones informadas sobre las medidas destinadas a manejo de las infecciones del virus.

Los marcadores moleculares de resistencia NAIS son específicos para el tipo de virus (A, B o C) así como también de drogas específicas. El cambio H275Y es la mutación más frecuente que confiere resistencia a oseltamivir en el subtipo N1 de NA. Este cambio se ha reportado no sólo en los virus H1N1 de influenza estacional, sino también en los virus H5N1 de alta patogenicidad. La mutación H275Y es también conocida por reducir susceptibilidad a un NAI en investigación llamado Peramivir. La sustitución de aminoácidos N295S en N1 también ha demostrado que reduce la susceptibilidad a oseltamivir y zanamivir. Además, estudios recientes han demostrado que mutaciones en otros residuos ubicados en los alrededores del sitio activo de la NA pueden alterar la susceptibilidad del virus a los NAIS. Por ejemplo, cambios en los residuos V116, I117, E119, Q136, D199 y I223 se asociaron con reducir la susceptibilidad a los NAIS, tanto en el virus de la influenza estacional y los virus H5N1. Además, los estudios con la estructura cristalina de la NA en los virus H1N1 y H5N1 sugiere que los cambios en los aminoácidos Q136 (Hurt, 2009), K150, D151 (Russel *et al.*, 2006) puede afectar la susceptibilidad a oseltamivir y zanamivir, probablemente al interferir con la unión de la droga a la NA (McKimm-Breschkin, 2003).

Hasta el 23 de Enero de 2011, 319 casos de Influenza A(H1N1) pdm resistentes a oseltamivir han sido reportados en todo el mundo. Todos los casos contienen la mutación H275Y, excepto uno, el cual tiene un cambio en la posición 223 de la NA, relacionado con reducir la susceptibilidad del virus a oseltamivir y zanamivir. (OMS, 2011)

Todos los virus resistentes a oseltamivir poseen la sustitución H275Y que confiere resistencia al oseltamivir, pero no al zanamivir. La propagación del virus A(H1N1) de la gripe estacional resistente al oseltamivir se detectó por primera vez en 2007 y este virus ha venido a formar parte del linaje predominante del virus de influenza A(H1N1) en los seres humanos (Sheu *et al.*, 2008, Dharan *et al.*, 2009). Este descubrimiento plantea serios pronósticos, de que la mutación H275Y podría convertirse en dominante en el virus de la influenza A(H1N1) pandémica también.

Actualmente existen diferentes métodos moleculares para la detección de resistencia del virus de la Influenza a los antivirales que se usan para su tratamiento, uno de ellos se basa en someter fenotípicamente el cultivo del virus al antiviral a evaluar, otros, complementarios a este, consisten en la detección de los marcadores que confieren resistencia, a partir de una amplificación del material genético del virus por la técnica de retrotranscripción acoplada a una reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) y la posterior secuenciación del fragmento amplificado (pirosecuenciación y secuenciación capilar)(Russel *et al.*, 2006; Hurt, 2009, Ramírez *et al.*, 2011).

3.9 Transcriptasa Reversa-Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa o PCR (Polymerase Chain Reaction), permite la amplificación *in vitro* de una secuencia específica de DNA y se realiza mediante el uso de un par de iniciadores que flanquean la secuencia de DNA a amplificar, y de ciclos repetidos de síntesis de nuevas cadenas de DNA por acción de una DNA polimerasa. Básicamente cada ciclo de amplificación se divide en tres etapas.

La primera etapa consiste en la desnaturalización del DNA, separándose las dos cadenas por ruptura de los enlaces de hidrógeno. Las condiciones típicas de desnaturalización son 95°C por 30 segundos, o 97°C por 15 segundos; sin embargo temperaturas más altas pueden ser apropiadas especialmente para templados ricos en G + C. La desnaturalización incompleta permite el apareamiento de las hebras de DNA y por lo tanto se reduce el rendimiento del producto. En contraste, la desnaturalización a altas temperaturas o por mucho tiempo provoca pérdida de la actividad de la enzima.

La Segunda etapa consiste en la hibridación o alineamiento de los iniciadores: para ello se baja la temperatura y las condiciones serán tales que se facilitará la unión de los iniciadores a las cadenas; la temperatura y el tiempo requerido para el alineamiento de los iniciadores depende de la composición, tamaño y concentración de los iniciadores amplificadores. Una temperatura de alineamiento óptima es 5°C por debajo de la T_m de los iniciadores. Debido a que las DNA polimerasas son activas en un amplio rango de temperaturas, la extensión de los iniciadores puede ocurrir a bajas temperaturas incluyendo el paso de alineamiento. El rango de actividad de las enzimas varía entre 20 y 85°C. Las temperaturas de alineamiento en el rango de 55 a 72°C generan buenos resultados.

La tercera etapa es la extensión, esta reacción se efectúa a 72° C, temperatura a la cual, la polimerasa lleva a cabo su acción, insertando los diferentes nucleótidos complementarios en el orden que le va indicando la cadena que actúa como molde. El tiempo de extensión depende de la longitud y concentración de la secuencia blanco y de la temperatura. La extensión del iniciador se realiza tradicionalmente a 72°C.

Las estimaciones para la tasa de incorporación de nucleótidos a 72°C varía de 35 a 100 nucleótidos por segundo, dependiendo del buffer, pH, concentración de sales y la naturaleza del templado. Un tiempo de extensión de un minuto es considerado suficiente para productos de hasta 2 kb de longitud. Sin embargo, tiempos mayores de extensión pueden ser útiles cuando la concentración del sustrato es muy pequeña.

El éxito de una PCR depende en gran medida de la optimización de los diferentes parámetros involucrados en el proceso:

DNA molde: Es requerida la presencia de por lo menos una cadena completa de DNA con la secuencia por amplificar y con una cantidad mínima de contaminantes para no inhibir la reacción de polimerización.

Iniciadores: Su diseño es un parámetro esencial para la obtención reproducible de un producto de amplificación específico. Los iniciadores deben corresponder a secuencias únicas en la región a amplificar, particularmente en los extremos 3', su temperatura de desnaturalización para ambos iniciadores debe ser similar, además entre ellos no debe haber complementariedad para evitar la formación de dímeros que interfieran en la amplificación, su temperatura de fusión debe de estar 50-65 °C, contenido de GC 40-60%, su tamaño generalmente 18-30 nucleótidos de longitud.

dNTP's (2'-desoxirribosanucléosido 5'-trifosfato): La concentración de la mezcla equimolar de los cuatro dNTP's debe ser suficientemente alta para permitir la realización de todos los ciclos de amplificación (20-200µM).

DNA polimerasa requerida para la formación de las nuevas cadenas.

Iones Mg⁺⁺ que participan como cofactores de la Taq DNA polimerasa, y regular la actividad y la fidelidad de la enzima.

Parámetros de los ciclos de amplificación: Primordialmente controlar los tiempos y las temperaturas utilizadas, durante los ciclos de amplificación.

El inconveniente de la PCR convencional es la ausencia de información cuantitativa exacta debido a la eficiencia de la amplificación. Si la eficiencia de la reacción permaneciera constante para cada ciclo de amplificación, la concentración de DNA posterior a la PCR sería directamente proporcional a la cantidad de DNA diana inicial. Lamentablemente, la eficiencia de la amplificación varía de una reacción a otra, así como en ciclos sucesivos de una misma reacción. En particular, en los últimos ciclos de la PCR los productos de la amplificación se forman de manera no exponencial y a una velocidad de reacción desconocida; la cuantificación del DNA basada en la PCR convencional se apoya en la medición en el punto final, a fin de conseguir la sensibilidad máxima, cuando la amplificación alcanza el rendimiento máximo (la denominada «fase meseta»). En esta etapa la reacción ha superado la fase exponencial, a causa fundamentalmente del agotamiento de los reactivos y de la inactivación térmica gradual de la polimerasa utilizada. Por ello, la correlación resultante entre la concentración del producto final y el número de moléculas diana iniciales es limitada. Para superar este problema se han desarrollado la PCR en tiempo real, que se proponen establecer una relación entre la

concentración de DNA diana y la cantidad de producto de la PCR generada por la amplificación (Walker, 1988; Aoyagi, 2001).

La amplificación del RT-PCR se realiza mediante un proceso de dos etapas. En la primera etapa se utiliza una enzima llamada Transcriptasa reversa (RT) que sintetiza una cadena de DNA complementaria al RNA de interés (cDNA). En la segunda etapa se utiliza este cDNA como material de inicio para la amplificación mediante la PCR utilizando una DNA polimerasa termoestable (Adams *et al.*, 1992; Jones *et al.*, 1994).

Mientras que la PCR convencional revela la presencia de un gen en particular, la RT-PCR indica en que medida se ha expresado el gen de interés.

3.10 Secuenciación

La secuencia de los nucleótidos presentes en las cadenas o bandas de los ácidos nucleicos constituye la base del código genético. Cada codón es definido por un triplete de nucleótidos que, a través del proceso conocido como traducción, es interpretado como una letra que corresponde a un aminoácido específico. En términos generales, la secuencia de codones que constituyen un gen, codifican la secuencia de aminoácidos que constituyen una proteína en particular.

En los últimos años se han desarrollado una variedad de técnicas y métodos que permiten determinar la secuencia de nucleótidos en cualquier tipo de ácido nucleico. La primera secuencia completa de un RNA viral fue determinada en el fago MS2 por el grupo de Walter Fiers en 1976. En 1977, Fred Sanger y colaboradores publicaron la secuencia completa del

genoma del fago Φ X174, constituido por DNA de cadena sencilla. Posteriormente, muchos otros genomas virales de mayor tamaño y complejidad han sido secuenciados en parte o en su totalidad. Una vez que se conoce la secuencia del genoma viral es posible establecer la forma como están organizados los genes presentes en el ácido nucleico. Los avances de la Biología Molecular han permitido determinar la naturaleza de la secuencia de nucleótidos que actúan como signos de puntuación en la lectura de la información genética (Aranda, 1991).

La PCR se ha convertido en una vía rápida para obtener y secuenciar fragmentos de DNA o RNAm. La secuenciación de los productos de PCR ha permitido obtener secuencias desconocidas de genes conocidos inclusive ha permitido la obtención de secuencias de genes desconocidos, y con esto, la identificación y clonación de genes que codifican para proteínas desconocidas.

El análisis de las secuencias de nucleótidos de algunos genes se ha constituido en el estándar de oro para la clasificación y tipificación, pues permite establecer desde árboles filogenéticos hasta relaciones genéticas entre cepas y aislamientos de una misma especie.

La metodología utiliza un iniciador, los cuatro desoxinucleótidos trifosfatados (dNTP's), una DNA polimerasa y nucleótidos que carecen de oxígeno en las posiciones 3' y 4' de la ribosa (3' 4' dedeoxirribosa o dideoxinucleotidos ddNTP's).

El método más común actualmente es el de Sanger, se basa en la terminación de prematura de síntesis de DNA por incorporación de dideoxinucleotidos. La síntesis de DNA es iniciada por un oligonucleótido marcado; en tubos donde se preparan cuatro reacciones, una para cada uno

de los dideoxinucleótidos A, T, G y C. Estos ddNTP's se incorporan en la cadena igual que los dNTP's, pero como estos carecen del grupo hidroxilo (-OH) en la posición 3' de la desoxiribosa no pueden ser atacados por el fosfato, evitando la formación de un enlace fosfidéster, del siguiente nucleótido (dNTP) y por lo tanto detienen el crecimiento de la cadena a la que se incorporan, para esto se requiere que en la reacción se adicionen cantidades mayores de ddNTP's que de los dNTP's.

La secuencia de DNA es determinada por el orden de fragmentos (Barrera *et. al.*, 1993; Bobadilla y Gamba, 1996).

4. JUSTIFICACIÓN

Los virus de RNA de cadena sencilla presentan una gran tasa de mutaciones, entre otras cosas por consecuencia de errores producidos por la RNA Polimerasa, originando mutaciones generalmente “silenciosas”, sin embargo, es factible originar la sustitución de un aminoácido por otro. En el virus de la Influenza, la mayor parte del monitoreo que se realiza sobre las mutaciones que adquiere, es para conocer la virulencia, la transmisibilidad así como la resistencia del virus a algunos antivirales. Entre los años 2007 y el 2008, la resistencia del virus de Influenza estacional H1N1 a oseltamivir fue menor al 1%, alcanzando un 99.6% durante el primer trimestre de 2009. Existe la probabilidad de que el virus de influenza pandémica A(H1N1) se comporte de manera similar al virus estacional y tomando en cuenta que este virus presenta resistencia a los Adamantanos, el zanamivir sería el único antiviral disponible para el tratamiento de la influenza pandémica. Por lo anterior, se justifica de manera importante establecer métodos moleculares que permitan monitorear las mutaciones que confieren resistencia a zanamivir, complementando la vigilancia de la resistencia a los inhibidores de la Neuraminidasa. Una vez concluido este proyecto, el laboratorio podrá realizar este monitoreo de manera eficaz, lo cual tiene implicaciones importantes en la toma de decisiones en caso de identificar alguna cepa mutante.

5. HIPOTESIS

Se ha demostrado que las mutaciones en las posiciones Q136, K150 y D151, en el gen 6 (NA) del virus de la influenza A(H1N1) pdm confieren resistencia a zanamivir. Si se estandariza una técnica que permita la detección eficaz de estos marcadores, será posible identificar cepas resistentes a este antiviral rápidamente en la población, permitiendo tomar acciones oportunas para la no propagación del virus con la nueva mutación.

6. OBJETIVOS

General:

- Estandarizar el proceso RT-PCR/Secuencia para detectar los marcadores moleculares (Q136, K150 y D151) en el gen de la Neuraminidasa que confieren resistencia a zanamivir en el virus de la Influenza A(H1N1) Pandémica.

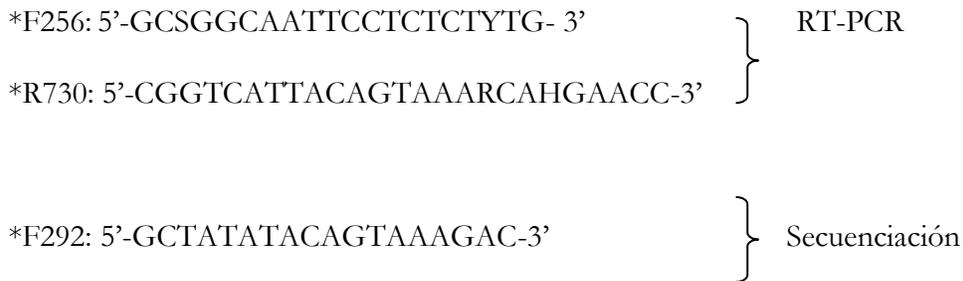
Particulares:

- Seleccionar iniciadores específicos que amplifiquen la región de interés.
- Obtener el material genético (RNA) a partir de muestras clínicas previamente seleccionadas y cultivos celulares del virus de la Influenza A(H1N1) pdm.
- Seleccionar muestras positivas a Influenza A(H1N1) pdm, las cuales puedan contener las mutaciones buscadas de acuerdo a su historia clínica.
- Optimizar el proceso de RT-PCR del virus de la Influenza A(H1N1) pdm.
- Secuenciar el segmento obtenido en la RT-PCR para la detección de las posiciones de interés.
- Analizar bioinformáticamente los marcadores moleculares que confieren resistencia a zanamivir

7. MATERIAL Y MÉTODO

a) Selección de Iniciadores

Se hizo una selección de iniciadores específicos para llevar a cabo la amplificación de la región de interés, se realizaron alineaciones de los iniciadores con la herramienta BLASTn para conocer la posición donde alinean y que estos fueran específicos para el gen de la Neuraminidasa. Se seleccionó un forward F256 y un reverse R730, se usó un tercer primer para llevar a cabo la secuencia de este amplicón, un forward 292.



* Diseño de Primers tomado de: Deyde *et al.*, 2010.

b) Selección de Muestras

Se analizaron 25 cultivos celulares probados fenotípicamente como sensibles a zanamivir, esto para llevar a cabo la estandarización del método, una vez estandarizado, se analizaron muestras procedentes de cultivos celulares y muestras clínicas, con el propósito de probar el método en varios tipos de muestras, todas ellas positivas para influenza A(H1N1) pdm, esto según el método de rRT-PCR (RT-PCR en Tiempo Real) establecido por el CDC (Center of Disease Control and Prevention) y la OMS (Organización Mundial de la Salud) para el diagnóstico de Influenza A(H1N1) pdm.

c) Extracción de RNA

Las extracciones fueron realizadas empleando el Robot MagNa Pure LC 2.0 System y el estuche Total Nucleic Acid Isolation Kit (Roche), siguiendo las instrucciones y de acuerdo a las recomendaciones de los protocolos del CDC (Center of Disease Control and Prevention) y la OMS (Organización Mundial de la Salud), para el diagnóstico de Influenza A(H1N1) pdm. Brevemente, se colocaron los consumibles utilizados por el robot en el proceso (puntas, cámaras de elusión, cámaras de reactivos, placas y tubos), las muestras a extraer fueron colocadas en una placa especial para este fin y se colocó dentro del robot, finalmente el robot fue programado para realizar una extracción total de ácidos nucleicos, una vez terminado el proceso, los extractos fueron colocados en tubos Eppendorf de 1 ml.

d) Reacción en Cadena de la Polimerasa

Se llevó a cabo una transcripción reversa acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa punto final (RT-PCR) usando un Termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems), utilizando el estuche SuperScript III Platinum One-Step RT-PCR System (Invitrogen). Las claves de las muestras a amplificar fueron registradas en una hoja de protocolo, los tubos fueron marcados según la clave de la muestra que contendrían, siempre colocados en una gradilla fría, la mezcla de reacción fue preparada para el número de muestras a trabajar con los siguientes volúmenes de reactivos, considerando control positivo y negativo (Tabla 1):

Tabla 1: Volúmenes de reactivos utilizados en la mezcla de reacción para la RT-PCR.

<i>Reactivo</i>	<i>μl/ rxn</i>
Buffer 2x	. 12.5 μl.
Iniciador R (10 pmol/μl.)	1 μl.
Iniciador F (10 pmol/μl)	1 μl
RT/Taq mix	0.5 μl.
Agua	5 μl.

Se colocaron 20 μl de la mezcla de reacción a cada tubo Eppendorf, más 5 μl. del extracto de RNA en el tubo correspondiente, los tubos fueron mantenidos en frío hasta ser colocados en el termociclador, una vez en él, se programó este de acuerdo al siguiente protocolo de amplificación (Fig. 6):

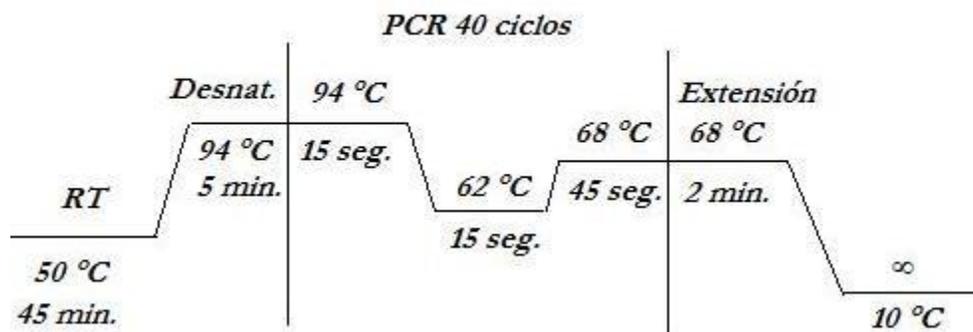


Figura 6: Protocolo de amplificación (RT-PCR).

e) Cuantificación

La cuantificación de los productos obtenidos en la RT-PCR se llevó a cabo con el 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies), con el cual se verificó el tamaño del amplicón generado y la concentración de cDNA obtenido en la reacción.

Se preparó el DNA Microchip con los reactivos correspondientes, de la siguiente manera:

- 9 µl de Gel Matrix en el pozo concentrador “G” y presurizar
- 9 µl de Gel Matrix en los pozos de “G” superiores
- 5 µl de Markers en cada uno de los pozos de las muestras problema y en el pozo de la escalera alélica
- 1 µl de Ladder en el pozo de escalera alélica
- 1 µl de muestra problema en cada uno de los 12 pozos del DNA Microchip
- El microchip fue colocado en el vortex a 2400 RPM por 1 min

Finalmente, el chip fue colocado en el 2100 Bioanalyzer para su análisis.

f) Secuenciación

La secuenciación se llevó a cabo usando el método de Sanger, que se basa en la formación de fragmentos de diferentes tamaños usando dideoxynucleótidos terminadores y posteriormente la secuenciación automatizada capilar en el secuenciador AbiPrism 3130xl (Applied Biosystems).

1) Purificación enzimática

Se llevó a cabo una purificación enzimática utilizando el estuche Exo Sap IT (Affymetrix) para productos de PCR, por cada 5 μl . de producto de PCR se agregaron 0.5 μl . de la enzima Exo Sap IT, manteniendo las muestras en frío durante la preparación de la reacción hasta que fueron colocadas en el termociclador, una vez colocadas en él, estas fueron incubadas a 37° C por 15 min., posteriormente la enzima fue inactivada a 85° C por 15 min. y finalmente los productos fueron mantenidos a 4° C, hasta que se realizó la reacción de secuencia.

2) Reacción de Secuencia

La reacción se llevó a cabo en el Termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems) utilizando el estuche Big Dye 3.1v (Applied Biosystems). El volumen de DNA a utilizar en la reacción se determinó en base a los resultados que se obtuvieron en la cuantificación y de acuerdo a las recomendaciones hechas por el fabricante del estuche aquí utilizado, ya que el amplicón generado es de aproximadamente 473 pb, se utilizaron de 3 a 10 ng. por μl . Los tubos de PCR fueron etiquetados indicando el nombre del producto y el iniciador utilizado. Los siguientes reactivos fueron adicionados a cada tubo (Tabla 2):

Tabla 2: Cantidad de reactivos utilizados en la reacción de secuencia.

Reactivo	Cantidad
Mezcla de Reacción	2 μl
Iniciador (3.3 pmol/ μl)	1 μl
Buffer de Secuenciación 5x	2 μl
Producto de PCR de 200-500 pb	3-10 ng x μl
Agua grado Biología Molecular	Se ajusto el volumen a 20 μl

Una vez preparados los tubos, se mezclaron vigorosamente con el vortex cuidando que el producto quedara en el fondo del tubo, estos fueron colocados en el termociclador y se llevó a cabo la reacción de secuenciación por 40 ciclos de acuerdo a las siguientes condiciones:

- Desnaturalización a 96° C
- Alineación a 50° C
- Extensión a 60° C
- Se mantuvieron a 4° C hasta que se lleve a cabo la purificación de los productos.

3) Purificación y lectura de secuencias

Se utilizaron placas CentriSep 96 (Princeton Separations), se removió la tela adhesiva superior e inferior de la placa, esta fue centrifugada para eliminar el líquido de hidratación, una vez realizado esto, la placa CentriSep se colocó sobre la placa óptica de 96 pozos para secuenciador 3130xl, se colocó cada una de las muestras en el pozo correspondiente de la placa CentriSep, esta fue centrifugada por 3 minutos a 3000 RPM, una vez teniendo los productos purificados en la placa óptica, se colocó 5 minutos en el termociclador a una temperatura de 95°C y posteriormente en hielo durante dos minutos, esto para desnaturalizar las cadenas y mantenerlas así durante la lectura de la secuencia, posteriormente, la placa fue colocada en el secuenciador 3130xl. El Secuenciador fue programado para realizar la lectura de las secuencias mediante el software *Data Collection*.

g) Análisis, Edición y Alineación de Secuencias

Análisis: El análisis de las lecturas obtenidas una vez terminada la electroforesis capilar en el secuenciador se llevó a cabo con el software *Sequencing Analysis*, se abrieron los archivos guardados en la memoria de la máquina con el programa, posteriormente fueron analizados con el llamador de bases, el cual asigna la letra de la base correspondiente a cada pico generado en la lectura, de esta manera se generaron los archivos en formato .abi de cada una de las secuencias analizadas.

Edición: La edición de las secuencias se llevó a cabo con el software *Chromas*, se extrajeron los archivos .abi de la máquina del secuenciador, estos archivos fueron abiertos cada uno en el software y se fue editando uno a uno, primero eliminando los extremos de la secuencia que no tienen una correcta lectura y posteriormente analizando cada uno de los picos para corroborar que se le haya asignado la base correcta, una vez terminada la edición, se creó un archivo FASTA con la secuencia de nucleótidos.

Alineación: La alineación de las secuencias se llevó a cabo con los siguientes softwares:

- ✓ BLASTn (Basic Local Alignment Searching Tool): Este programa se encuentra en línea, fue desarrollado por el NCBI (Nacional Center of Biotechnology Information). Se utilizó para corroborar que la secuencia del amplicón generado corresponda al gen que deseábamos amplificar., el formato FASTA obtenido de las ediciones, se cargo en línea

en la página de este software, indicándole hacer una alineación local de secuencia de nucleótidos.

- ✓ *Clustal X* y *BioEdit*: Se utilizaron para observar las diferentes mutaciones encontradas en nuestras secuencias y corroborar si implicaban un cambio de aminoácido, con el mismo formato FASTA obtenido de las ediciones, se cargo el archivo en cada uno de los programas, esta vez realizando un alineamiento global, el primero nos sirvió para identificar cada una de las mutaciones y el segundo para identificar aquellas que implican el cambio de un aminoácido.
- ✓ *FluSurver*: Este programa fue desarrollado por el A*STAR Bioinformatics Institute y el Instituto Nacional de Medicina Genómica, es usado solo para secuencias del virus de la Influenza, brinda información acerca de las mutaciones que se encuentran en cada una de ellas. Las mutaciones reales encontradas en las secuencias se analizaron con este software para corroborar la implicación que tenían y si se habían encontrado ya en otras cepas. El formato FASTA obtenido de las ediciones se cargó en línea en la página de este programa, indicándole haga una alineación local pero solo entre cepas de Influenza A(H1N1) pdm, una vez terminado el análisis, se observaron cada una de las mutaciones y las características y posiciones de cada una de ellas.

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se realizó una búsqueda bibliográfica sobre las mutaciones puntuales que conferirían resistencia al virus de la Influenza A(H1N1) pdm al Zanamivir y encontramos que los principales marcadores moleculares que confieren resistencia son: Q136, K150 y D151 (McKimm-Breschkin, 2003; Russel *et al.*, 2006; Hurt, 2009)

Q136: Nucleótido 408

Q-Glutamína (CAA o CAG) por K- Lisina (AAA o AAG)

K150: Nucleótido 450

K- Lisina (AAA o AAG)

D151: Nucleótido 453

D- Ácido Aspártico (GAC) por N- Asparagina (AAT ó AAC)

Una vez localizados estos marcadores, se seleccionaron iniciadores específicos para el gen de la Neuraminidasa de este agente viral, los cuales fueran capaces de amplificar la región donde se encontraban estos marcadores.

Se seleccionaron los siguientes iniciadores:

Iniciador forward para amplificar desde la posición 256 del gen de la Neuraminidasa.

F256: 5'-GCSGGCAATTCCTCTCTYTG- 3'

Iniciador reverse para amplificar hasta la posición 730 del gen de la Neuraminidasa (Deyde *et al.*, 2010).

R730: 5'-CGGTCATTACAGTAAARCAHGAACC-3'

Inicialmente se realizaron pruebas de RT-PCR con cultivos positivos para Influenza A(H1N1) pdm con la finalidad de estandarizar la temperatura óptima de alineación de los iniciadores, ya que de esta depende la especificidad de la prueba (Walker, 1988; Aoyagi, 2001). Se inicio con una temperatura de de 55 °C y se obtuvo el siguiente producto de PCR (Fig. 7).

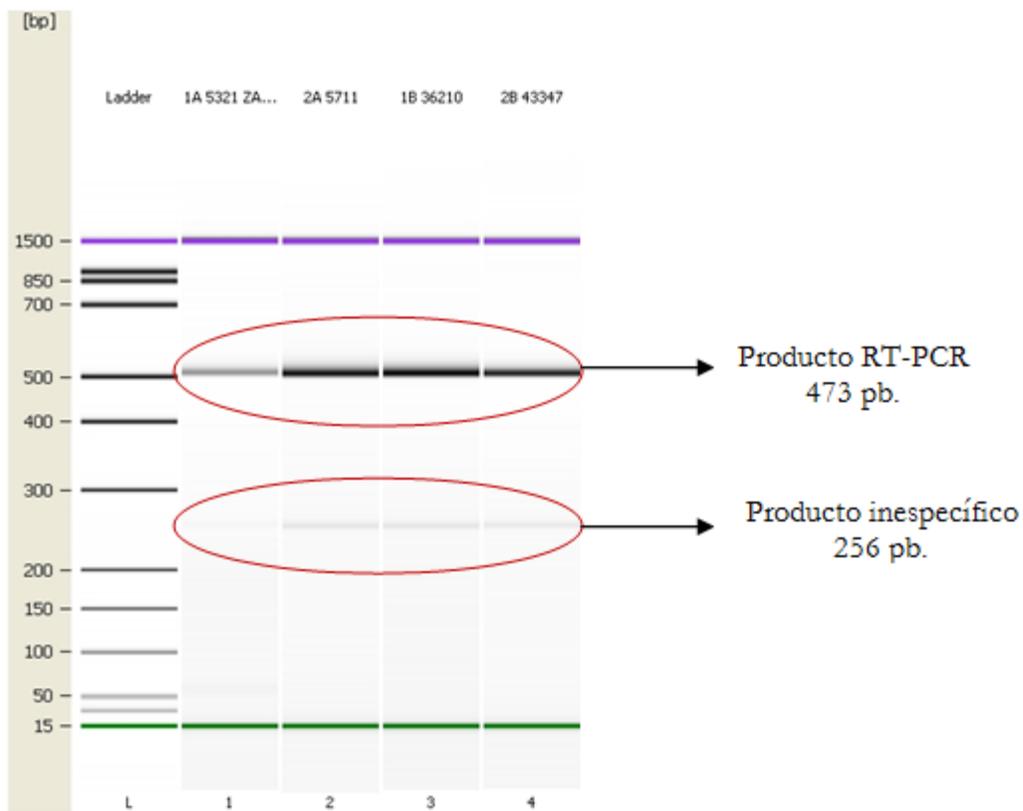


Figura 7: Cuantificación de los productos de RT-PCR realizada con el 2100 Bioanalyzer, se muestran las bandas de 473 pb y las bandas inespecíficas generadas de 256 pb. Temperatura de alineación de iniciadores 55°C.

Se obtuvo un producto de 473 pb, el cual correspondió a un fragmento del gen NA lo cual nos indicó que la temperatura de alineación utilizada fue adecuada, sin embargo se observó la presencia de una banda de 256 pb diferente a la esperada (Fig. 7), esto se pudo deber a

contaminación o inespecificidad de los iniciadores. Con la finalidad de conocer si la banda no deseada procedía de una contaminación, se repitió el ensayo y se obtuvieron los mismos resultados, de tal forma que la presencia de estos fragmentos se debió a la inespecificidad de los iniciadores, probablemente porque estos poseen nucleótidos degenerados:

*F256: 5'-GC**S**GGCAATTCCTCTCT**Y**TG-3'*

*R730: 5'-CGGTCATTACAGTAAAR**C**A**H**GAAACC-3'*

Se incrementó la temperatura de alineación de los iniciadores para aumentar la especificidad de la prueba, obteniendo mejores productos a 62 °C (Fig. 8).

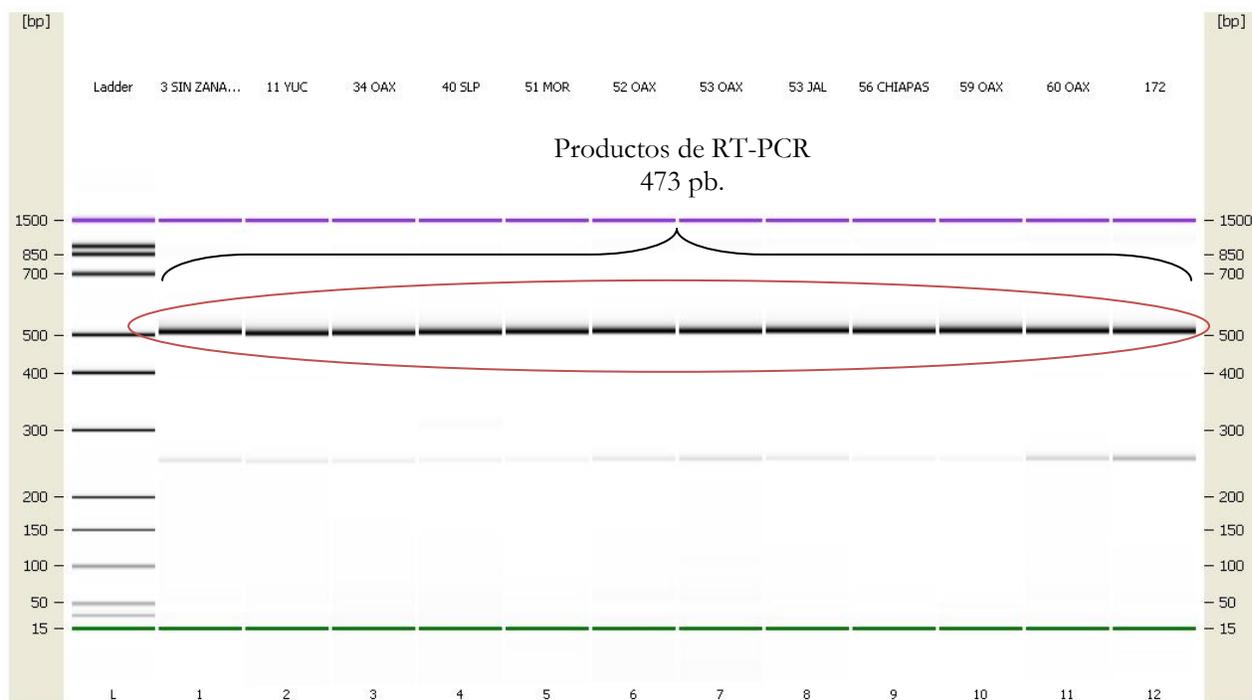


Fig. 8: Cuantificación de productos de RT-PCR realizada con el 2100 Bioanalyzer, se observan las bandas de 473 pb. y la disminución en la concentración de las bandas inespecíficas. Temperatura de alineación de iniciadores 62°C.

A esta temperatura de alineación de los iniciadores (62 °C) se logró disminuir la concentración de los productos inespecíficos (Fig. 8), sin embargo, con la finalidad de conocer la naturaleza de la inespecificidad, se purificó la banda inespecífica usando el sistema E-Gel® (Invitrogen), para su posterior secuenciación, y de esta manera observar el origen de la banda inespecífica; después de obtener la secuencia, se hizo una búsqueda de identidad en BLASTn (Fig. 9) y se observó que sí pertenecía a el virus de la Influenza A(H1N1) pdm, en el gen de la Neuraminidasa.

```

> gb|CY057432.1| Influenza A virus (A/Wisconsin/629-D01935/2009 (H1N1)) segment
6, complete sequence
Length=1420

Score = 366 bits (198), Expect = 2e-98
Identities = 198/198 (100%), Gaps = 0/198 (0%)
Strand=Plus/Plus

```

Identities de la banda inespecífica

```

Query 1 TACAACTCAAGATTTGAGTCAGTCGCTTGGTCAGCAAGTGCTTGTTCATGATGGCATCAAT 60
      |||
Sbjct 510 TACAACTCAAGATTTGAGTCAGTCGCTTGGTCAGCAAGTGCTTGTTCATGATGGCATCAAT 569

Query 61 TGGCTAACAATTGGAATTTCTGGCCCAGACAATGGGGCAGTGGCTGTGTTAAAGTACAAC 120
      |||
Sbjct 570 TGGCTAACAATTGGAATTTCTGGCCCAGACAATGGGGCAGTGGCTGTGTTAAAGTACAAC 629

Query 121 GGCATAATAACAGACACTATCAAGAGTTGGAGAAAACAACATATTGAGAACACAAGAGTCT 180
      |||
Sbjct 630 GGCATAATAACAGACACTATCAAGAGTTGGAGAAAACAACATATTGAGAACACAAGAGTCT 689

Query 181 GAATGTGCATGTGTAAT 198
      |||
Sbjct 690 GAATGTGCATGTGTAAT 707

```

Fig. 9: Alineamiento local de la banda inespecífica utilizando la herramienta BLASTn, en rojo se muestra el resultado de la identidad.

Posteriormente se realizó una alineación en el programa Clustal X (Fig. 10) para observar la posición del producto amplificado inespecíficamente, usando como referencia secuencias completas del gen de la Neuraminidasa, se obtuvo la posición donde los iniciadores se alineaban inespecíficamente, en el nucleótido 509, se comprobó que el iniciador forward F256 es el que originó la banda inespecífica, ya que el final del producto corresponde al final de los productos buscados con estos iniciadores, por lo que el iniciador *reverse* se alinea en la región correcta.

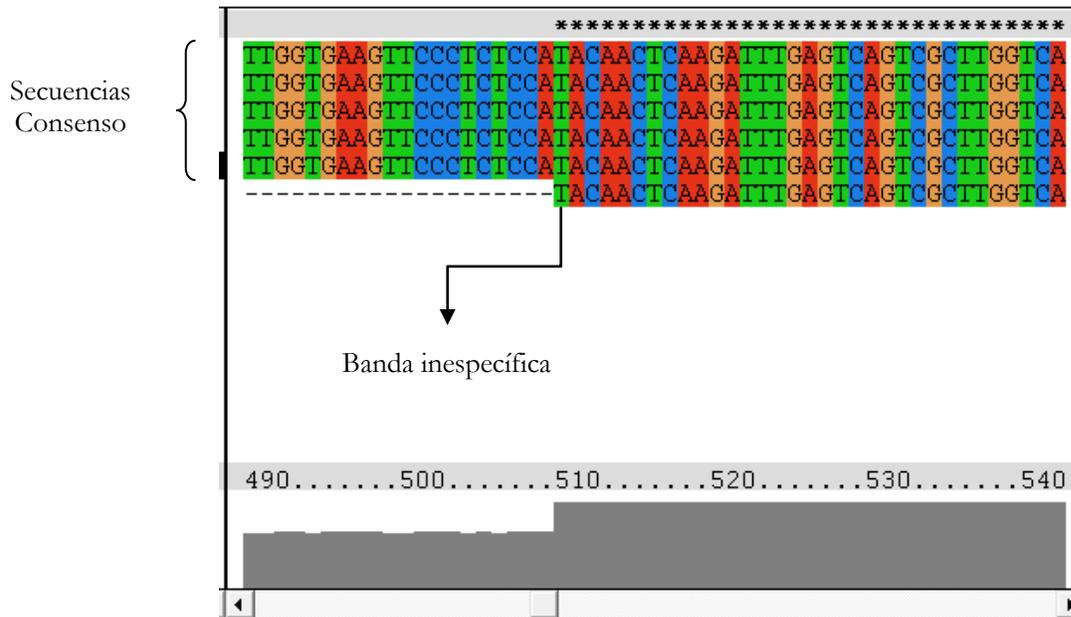


Fig. 10: Alineamiento múltiple de la secuencia obtenida de la banda inespecífica y secuencias consenso utilizando la herramienta Clustal X, se observa la posición 509 donde comienza la alineación de la banda inespecífica.

Finalmente, el programa de RT-PCR obtenido para generar los productos usados para analizar los 3 marcadores analizados en este trabajo fue el siguiente (Fig. 11):

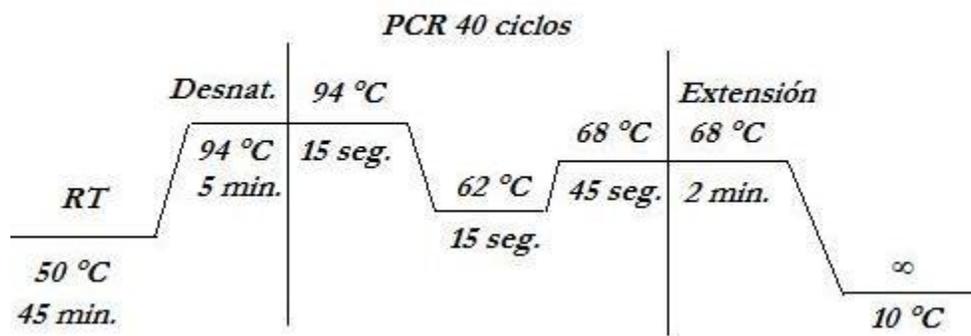


Fig. 11: Esquema de las condiciones utilizadas en los ciclos de la RT-PCR utilizada en este trabajo.

Para observar si la banda inespecífica obtenida en la RT-PCR intervenía en la secuencia del fragmento de interés, se llevó a cabo la secuenciación de este fragmento, usando los iniciadores F256 y R730 (Fig. 12).

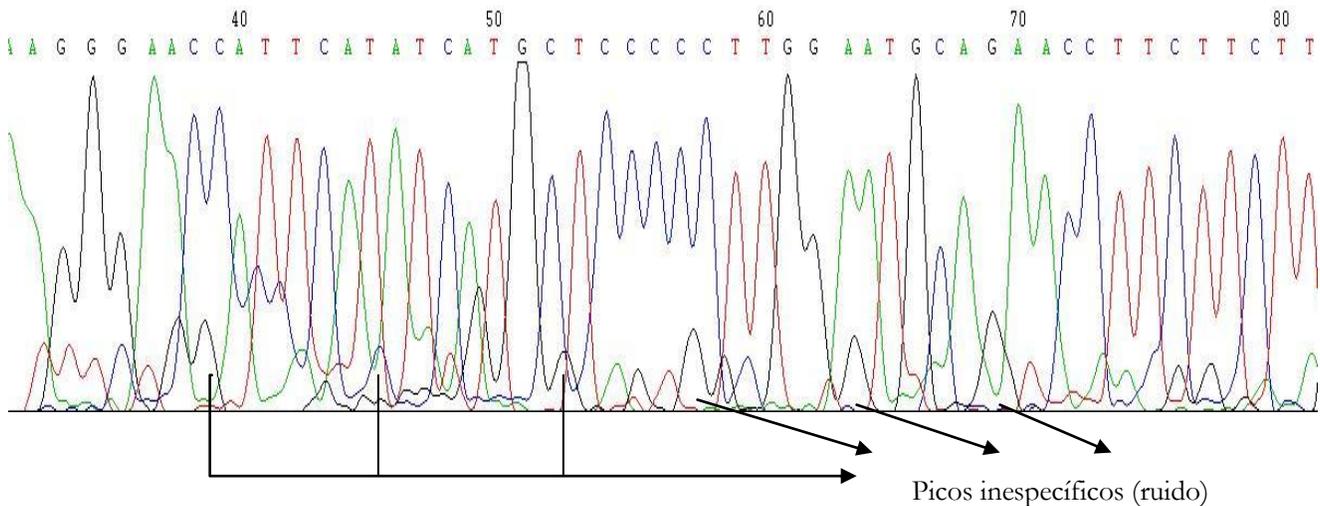


Figura 12: Electroferograma que muestra la secuencia nucleotídica de la banda de 473 pb. obtenida con los iniciadores F256 y R730, donde se muestra el ruido generado por la banda inespecífica.

Después de obtener la secuencia, se pudo observar la presencia de mezcla de nucleótidos en la base del electroferograma (Fig. 12), lo que nos indicó que la banda inespecífica también generaba una lectura, debido a esto, el análisis de las secuencias obtenidas con estos iniciadores sería difícil por la presencia de picos inespecíficos, además de que si existiera la presencia de una mezcla de dos cepas en alguna de las muestras analizadas, esta no podría ser identificada adecuadamente.

Debido a estos inconvenientes, se buscó un iniciador diferente, el cual se alineara internamente en el fragmento generado con los iniciadores F256 y R730, para ser utilizado como iniciador de secuencia, evitando que la banda inespecífica interfiriera en la secuenciación (Fig. 13), este

iniciador fue el forward F292, el cual se alinea en la posición 292 del gen la Neuraminidasa (Deyde *et al.*, 2010).

F292 5'-GCTATATACAGTAAAGAC-3'

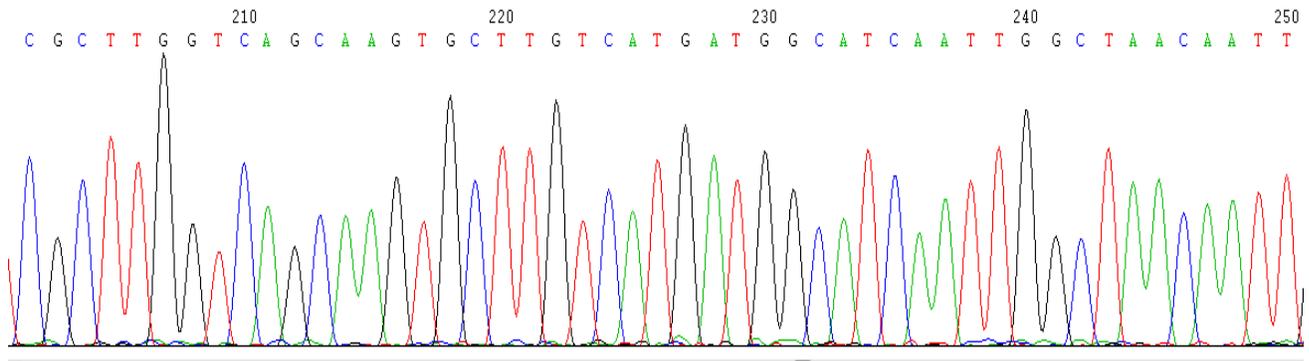


Figura 13: Electroferograma que muestra la secuencia nucleotídica de la banda de 473 pb obtenida con el iniciador F292, se observa que el uso del primer interno elimina el ruido en la base de lectura.

Se puede observar en el electroferograma (Fig. 13) que no existe la presencia de ruido (picos inespecíficos) en la base de este, ni se observa mezcla alguna, por lo que el uso del iniciador F292 en la secuenciación eliminó cualquier probabilidad de interferencia por parte de los productos inespecíficos y que las regiones donde se encuentran los marcadores a analizar se pueden leer nítidamente.

Finalmente, el mapa de amplificación usando estos iniciadores es el siguiente (Fig. 14):

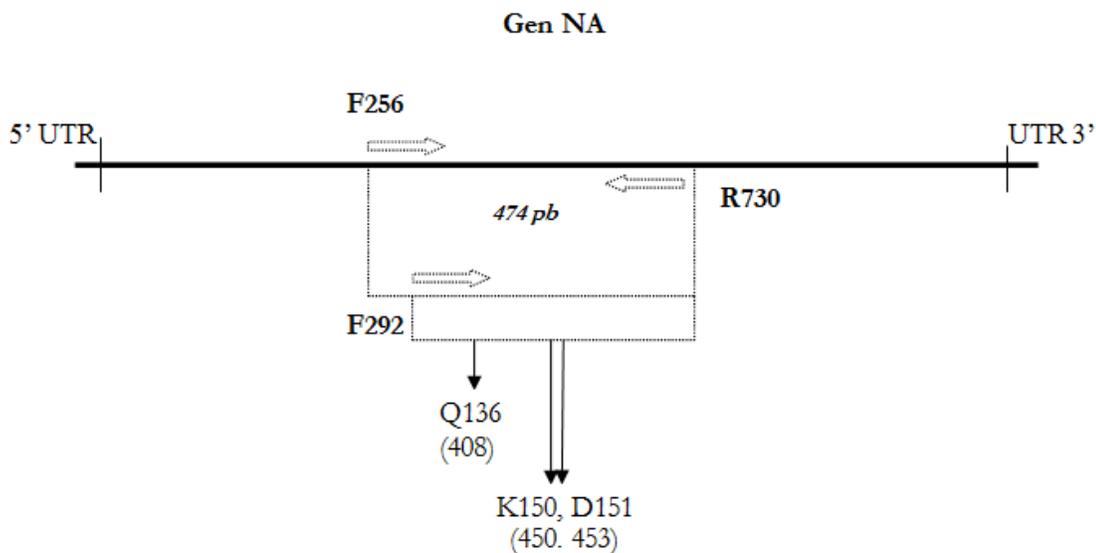


Figura 14: Mapa de amplificación que muestra la región amplificada en la PCR con los iniciadores F256 y R730 y el F292 para la secuenciación.

Una vez que se obtuvo la RT-PCR óptima para llevar a cabo la amplificación y la generación de los fragmentos donde se encuentran los marcadores a estudiar, así como establecer el primer utilizado para obtener su secuencia, se procesaron un total de 25 cultivos de Influenza A(H1N1) pdm, previamente reportados como fenotípicamente sensibles a zanamivir por el CDC (Center of Disease Control and Prevention).

Los electroferogramas obtenidos fueron editados con el programa *Chromas*, posteriormente se realizó una búsqueda de identidad en el BLASTn, esto para cada una de las muestras, con la finalidad de corroborar si la secuencia amplificada correspondía al gen de la Neuraminidasa (Fig. 15). La identidad obtenida corresponde al gen de la Neuraminidasa donde se encuentran los marcadores a analizar.

```

>gb|CY073794.1| Influenza A virus (A/San Francisco/01/2009(H1N1)) segment 6 sequence
Length=1349
Score = 736 bits (398), Expect = 0.0
Identities = 398/398 (100%), Gaps = 0/398 (0%)
Strand=Plus/Plus
      Identity of the products of
      RT-PCR

Query  2      GGGGGATGTGTTTGTTCATAAGGGGAACCATTCATATCATGCTCCCCCTTGGAAATGCAGAAC  61
      |||
Sbjct  302      GGGGGATGTGTTTGTTCATAAGGGGAACCATTCATATCATGCTCCCCCTTGGAAATGCAGAAC  361

Query  62      CTTCTTCTTGACTCAAGGGGCCTTGCTAAATGACAAACATTCCAATGGAACCATTAAAGA  121
      |||
Sbjct  362      CTTCTTCTTGACTCAAGGGGCCTTGCTAAATGACAAACATTCCAATGGAACCATTAAAGA  421

Query  122     CAGGAGCCCATATCGAACCCCTAATGAGCTGTCCCTATTGGTGAAGTTCCTCTCCATACAA  181
      |||
Sbjct  422     CAGGAGCCCATATCGAACCCCTAATGAGCTGTCCCTATTGGTGAAGTTCCTCTCCATACAA  481

Query  182     CTCAAGATTTGAGTCAGTCGCTTGGTCAGCAAGTGCTTGTTCATGATGGCATCAATGGCT  241
      |||
Sbjct  482     CTCAAGATTTGAGTCAGTCGCTTGGTCAGCAAGTGCTTGTTCATGATGGCATCAATGGCT  541

Query  242     AACAAATGGAATTTCTGGCCAGACAATGGGGCAGTGGCTGTGTTAAAGTACAACGGCAT  301
      |||
Sbjct  542     AACAAATGGAATTTCTGGCCAGACAATGGGGCAGTGGCTGTGTTAAAGTACAACGGCAT  601

Query  302     AATAACAGACACTATCAAGAGTTGGAGAAACAATATATTGAGAACACAAGAGTCTGAATG  361
      |||
Sbjct  602     AATAACAGACACTATCAAGAGTTGGAGAAACAATATATTGAGAACACAAGAGTCTGAATG  661

Query  362     TGCATGTGTAATGGTTCTTGGCTTTACTGTAATGACCG  399
      |||
Sbjct  662     TGCATGTGTAATGGTTCTTGGCTTTACTGTAATGACCG  699

```

Figura 15: Alineamiento utilizando la herramienta BLASTn donde se observa la identidad de la secuencia obtenida del fragmento de 400 pb. aproximadamente, utilizando el iniciador F292.

Las posiciones donde se encuentran los marcadores que confieren resistencia a Zanamivir fueron identificadas correctamente en los electroferogramas obtenidos de los 25 cultivos (Fig. 16) y no se encontraron mutaciones en estos marcadores, resultado esperado de acuerdo a la caracterización fenotípica realizada previamente, por lo tanto, todos los cultivos son sensibles fenotípica y genéticamente a esta droga. De esta forma, con estos cultivos se logro establecer el proceso de secuencia como óptimo.

Ya que se obtuvieron secuencias óptimas, las posiciones donde se encuentran los tres marcadores analizados fueron ubicadas, por lo que alguna mutación en estas posiciones o en cualquier otra de este fragmento, podrá ser identificada (Fig. 16).

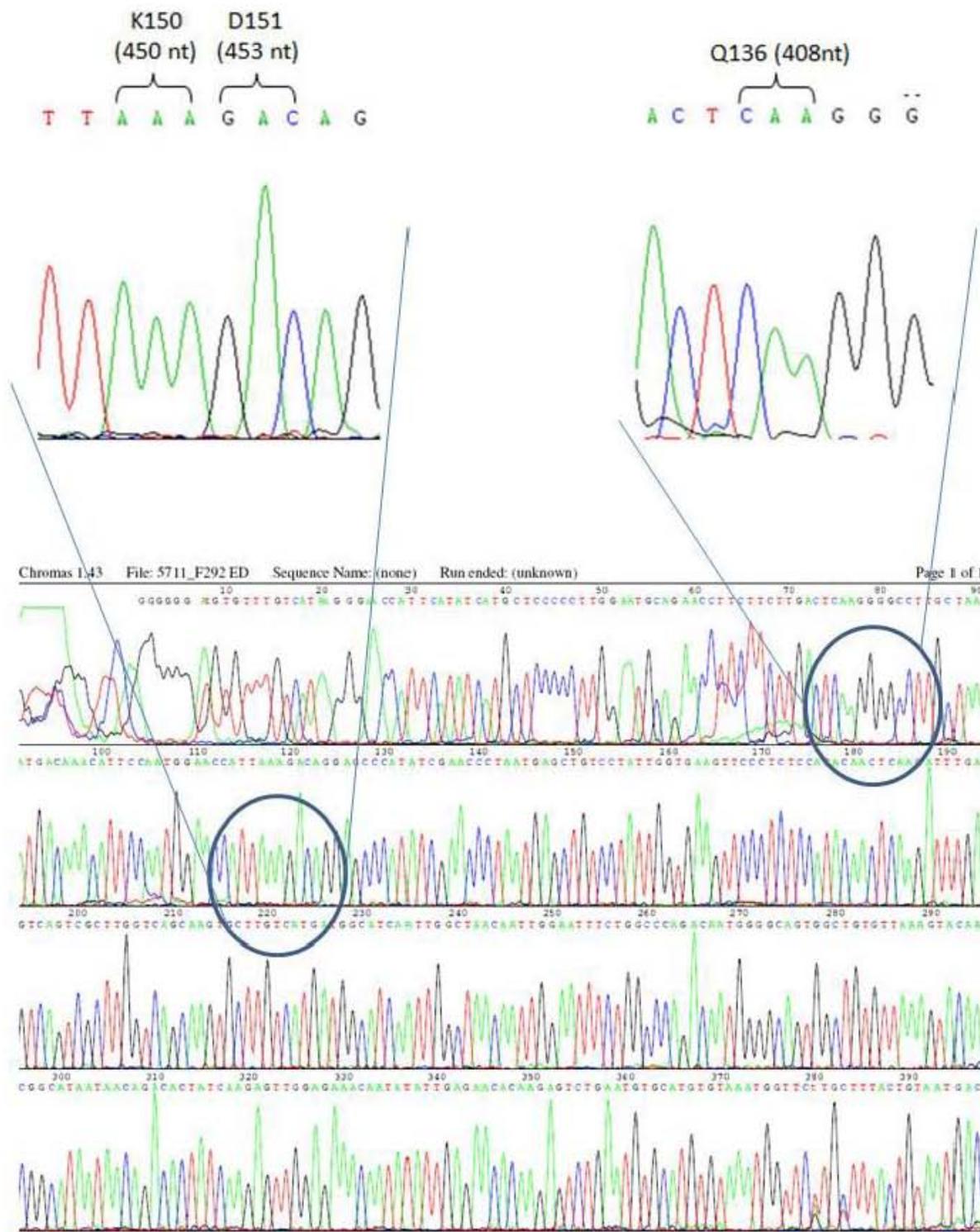


Figura 16: Electroferograma obtenido del fragmento amplificado en la RT-PCR, secuenciado con el primer F292 (400 pb. aprox.). Se muestran los 3 marcadores analizados en este trabajo, identificados en el electroferograma.

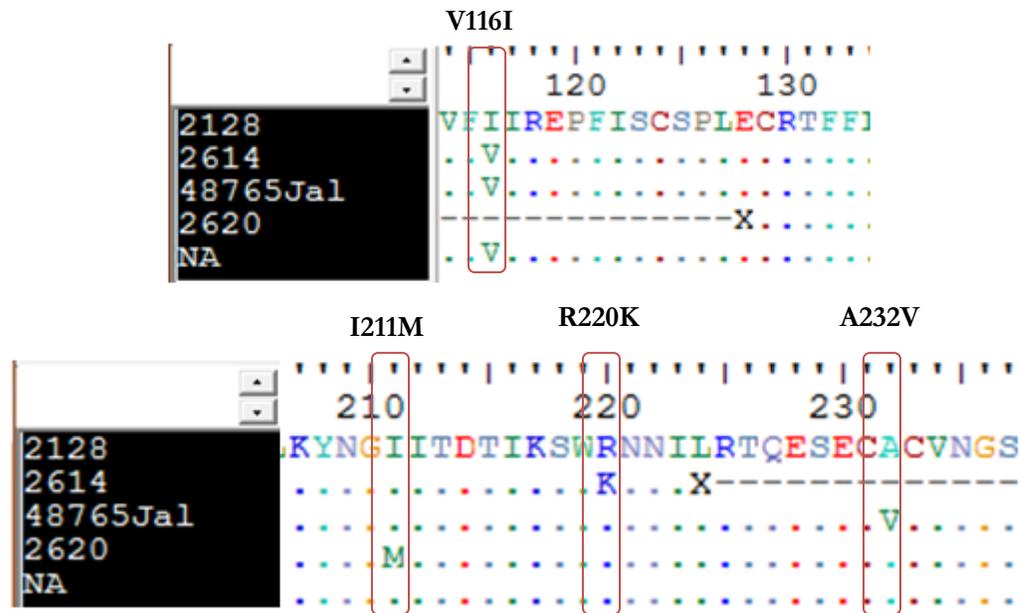


Figura 18: Alineamiento múltiple de aminoácidos, se muestran las posiciones de las mutaciones (V116I, I211M, R220K y A232V) encontradas en las muestras utilizando la herramienta BioEdit.

Las secuencias que presentaron mutaciones, fueron analizadas con el programa en línea Flu Surver, del A*STAR Bioinformatics Institute y el Instituto Nacional de Medicina Genómica, esto para obtener información acerca de las mutaciones encontradas (Tabla 3).

Tabla 3: Posiciones de las mutaciones encontradas en las muestras analizadas.

<i>Muestras con Mutaciones</i>	
Muestra	Mutaciones
2128	V116I
2614	R220K
2620	I211M
48765Jal	A232V

2128 (V116I): La mutación se ha encontrado hasta el momento en 6 muestras, en dos países. La primera muestra con esta mutación fue reportada en el año 2009 (A/New Hampshire/11/2009(H1N1)) (Shu *et al.*, 2009) y la más reciente fue reportada en Diciembre de 2009 (A/Wisconsin/629-D01904/2009(H1N1)) (Spiro *et al.*, 2010) (Fig. 19).

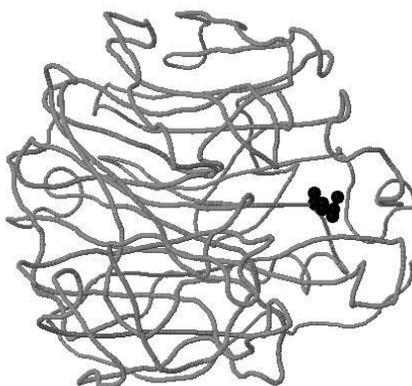


Figura 19: Estructura tridimensional de la Neuraminidasa, donde se muestra la ubicación de la mutación V116I.

2614 (R220K): Esta mutación ha sido reportada en 7 muestras en dos países. La primera muestra reportada fue colectada en Octubre del 2009 (A/Texas/46193311/2009(H1N1)). La más reciente fue colectada en Diciembre de 2009 (A/Wisconsin/629-D00337/2009(H1N1)) (Spiro *et al.*, 2010) (Fig. 20).

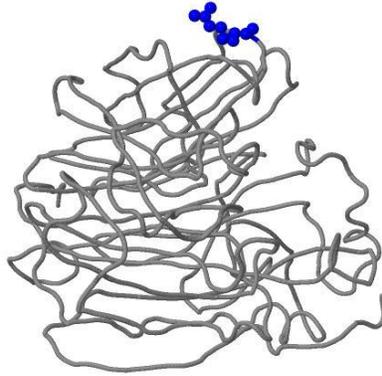


Figura 20: Estructura tridimensional de la Neuraminidasa, donde se muestra la ubicación de la mutación R220K.

2620 (I211M): Mutación no reportada en ninguna otra muestra del Genbank. La posición 211 de la NA participa en interfaces virales de oligomerización (Fig. 21).



Figura 21: Estructura tridimensional de la Neuraminidasa, donde se muestra la ubicación de la mutación I211M.

48765Jal (A232V): Esta mutación ha sido reportada en 4 muestras, todas ellas en diferentes países. La primera muestra fue colectada en Octubre de 2009 (A/Catalonia/S1620/2009(H1N1)) (Anton *et al.*, 2009) y la más reciente en Enero de 2010 (A/New York/3230/2010(H1N1)) (Spiro *et al.*, 2010) (Fig. 22).



Figura 22: Estructura tridimensional de la Neuraminidasa, donde se muestra la ubicación de la mutación A232V.

Podemos asegurar que la ultima mutación, no esta implicada en la resistencia del virus a ningún antiviral, pues pertenece a los cultivos que previamente fueron probados fenotípicamente para localizar tal resistencia, sin embargo, para las otras mutaciones encontradas, se propone llevar a cabo la misma prueba fenotípica, para descartar cualquier posible relación de estas con resistencia a algún antiviral.

9. CONCLUSIONES

- En el presente trabajo se logró desarrollar el método que permite la identificación de los tres marcadores moleculares que tienen implicación en conferir resistencia del virus de la Influenza A(H1N1) pdm al Zanamivir.
- La RT-PCR realizada en este trabajo es útil en muestras tanto de cultivo celular, como muestras clínicas y es específica para el estudio realizado.
- Se logró llevar a cabo detección de mutaciones en el segmento amplificado con los iniciadores utilizados.
- Todas las muestras analizadas son sensibles a Zanamivir, ya que no presentaron mutaciones en los marcadores aquí estudiados (Q136, K150 y D151).
- Las sustituciones encontradas no han sido reportadas en bases de datos como mutaciones que impliquen resistencia del virus de la Influenza A(H1N1) pdm al Zanamivir, sin embargo algunas de ellas se han identificado en otros países y es importante realizar pruebas antigénicas, fenotípicas y de virulencia para conocer si estas mutaciones tienen implicación en la biología del virus.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- **Adams R.L.P.**, Knowler J.T., Leader D.P. 1992. "The Biochemistry of the Nucleid Acids". Chapman and Hall. London. pp. 289-314.
- **Anton, A.**, Marcos, M.A., Martinez, M.J., Tudo, G., Costa, J., Dimova, V., Ramon, S., Isanta, R., Munoz, C., Gonzalo, V., Jimenez de Anta, M.T. y Pumarola,T. 2009. Microbiology Laboratory, Hospital Clinic. Datos en línea no publicados.
- **Aoyagi K.** 2001. PCR. Molecular biology problem solver a laboratory guide. USA. pp. 291-329.
- **Aranda A.A.** 1991. En la frontera de la vida: Los virus. Fondo de Cultura Económica, México. pp. 126-132.
- **Ayora T.G.** 1999. "Influenza: Historia de una enfermedad" Rev Biomed. Vol. 10. pp 57-61.
- **Barrera S.**, Ortiz L., Rojas M., Roséndez P. 1993. "Reacción en Cadena de la Polimerasa". Revista Ciencia y Desarrollo, Enero-Febrero. pp. 50-60
- **Bobadilla N.**, Gamba G. 1996. "Reacción en Cadena de la Polimerasa". Revista de Investigación Clínica. Septiembre-Octubre. Vol. 48. No. 5. pp. 401-406.
- **Bright RA**, Medina MJ, Xu X, Perez-Oronoz G, Wallis TR, Davis XM, Povinelli L, Cox NJ, Klimov AI. 2005. "Incidence of adamantane resistance among influenza A (H3N2) viruses isolated worldwide from 1994 to 2005: a cause for concern" Lancet. Vol. 366 No.9492 pp.1175-81.
- **Bright RA**, Shay DK, Shu B, Cox NJ, Klimov AI. 2006. "Adamantane resistance among influenza A viruses isolated early during the 2005-2006 influenza season in the United States" JAMA. Vol. 295 No. 8 pp. 891-4.
- **Brooks G.F.**, Carroll K.C., Butel J.S. y Morse S.A. 2008. "Microbiología médica de Jawetz, Melnick y Adelberg". El manual moderno. México D.F. pp. 553-572.
- **CDC** (Centers for Disease Control and Prevention). 2009. "Update: drug susceptibility of swine-origin influenza A(H1N1) viruses, April 2009". MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep. 58 pp. 433-435.

- **Colman P.M.** 1994. "Influenza virus neuraminidase: Structure, antibodies, and inhibitors". Protein Science. Vol. 3 pp. 1687-1696.
- **Curtis H. y Barnes N.** 2000. "Biología". Editorial Médica Panamericana. México, D.F.
- **Deyde M.V.**, Xu X, Bright RA, Shaw M, Smith CB, Zhang Y, Shu Y, Gubareva LV, Cox NJ, Klimov AI. 2007. "Surveillance of resistance to adamantanes among influenza A(H3N2) and A(H1N1) viruses isolated worldwide" J Infect Dis. Vol. 196 No. 2 pp. 249-57.
- **Deyde M.V.**, Sheu G. T., Trujillo A.A., Okomo-Adhiambo M., Garten R., Klimov I.A. y Gubareba V.L. 2010. "Detection of Molecular Markers of Drug Resistance in 2009 Pandemic Influenza A(H1N1) Viruses by Pyrosequencing", Antimicrobial Agents and Chemotherapy. Vol. 54 No. 3. pp. 1102-1110.
- **Dharan NJ**, Gubareva LV, Meyer JJ, Okomo-Adhiambo M, McClinton R C, Marshall SA, St George K, Epperson S, Brammer L, Klimov AI, Bresee JS, Fry AM; Oseltamivir-Resistance Working Group. 2009. "Infections with oseltamivir-resistant influenza A(H1N1) virus in the United States" JAMA. Vol. 301 No. 10 pp. 1034-41.
- **Gubareva L**, Okomo-Adhiambo M, Deyde V, Fry AM, Sheu TG, Garten R, Smith C, *et al.* 2009. MMWR Dispatch Vol. 58 / April 28.
- **Gubareva L. V.**, Webster, R. y Hayden F. 2001. "Comparison of the Activities of Zanamivir, Oseltamivir, and WJ-270201 against Clinical Isolates of Influenza Virus and Neuraminidase Inhibitor-Resistant Variants" Antimicrobial Agents and Chemotherapy. Vol. 45 No. 2. pp. 3403-3408.
- **Hay, A. J.**, M. C. Zambon, A. J. Wolstenholme, J. J. Skehel, and M. H. Smith. 1986. "Molecular basis of resistance of influenza A viruses to amantadine". J. Antimicrob. Chemother. Vol. 18 (Suppl. B) pp. 19-29.
- **Hurt C.A**, Holien K.J., Parker M., Kelso A. y Barr G.I. 2009. "Zanamivir-Resistant Influenza Viruses with a Novel Neuraminidase Mutation". JVI. Publicado en línea antes de la impresión.
- **Jones P.**, Qiu J. Rickwood D. 1994. RNA Isolation and analysis. BIOS Scientific Publishers Limited, Oxford, Inglaterra. pp. 178-235.

- **Kingsford C.**, Nagarajan N. y Salzberg S.L. 2009. “2009 Swine-Origin Influenza A(H1N1) Resembles Previous Influenza Isolates” PLoS ONE, Vol. 4 No.7. pp. 1-6
- **McKimm-Breschkin, J.**, T. Trivedi, A. Hampson, A. Hay, A. Klimov, M. Tashiro, F. Hayden, y M. Zambon. 2003. “Neuraminidase sequence analysis and susceptibilities of influenza virus clinical isolates to zanamivir and oseltamivir” Antimicrob. Agents Chemother. Vol. 47, pp. 2264–2272.
- **Meindl P;** Bodo G; Palese P; Schulman J; y Tuppy H. 1974. “Inhibition of neuraminidase activity by derivatives of 2-deoxy-2,3-dehydro-*N*-acetylneuraminic acid” Virology Vol. 58 No. 2 pp. 457-463.
- **OMS.** 2011. Reporte Mundial Sobre Resistencia del Virus A(H1N1) pdm a Oseltamivir.
http://www.who.int/csr/disease/influenza/2011_01_12_weekly_web_update_oseltamivir_resistance.pdf
- **Oubiña, J. R. y Sordelli, D.O.** 2009. “Indicaciones preliminares y provisionales ante la notificación de la OMS de decretar la fase 6 de alerta de pandemia de influenza de origen porcino” Dto. Microbiología, Parasitología e Inmunología, Facultad de Medicina, UBA.
- **Ramírez G. J.E.**, Gonzales D.E., Alcántara P.P., Wong A.C., Olivera D.H., Cortez O.I., Barrera B.G., Nguyen H., Gubareva L., López M.I., Díaz Q. J.A., Lezana F.M.A., López Gatell R.H., Cordova V.J.A., Hernández A.M. y Alpuche A.C. 2011. “Oseltamivir-Resistant Pandemic (H1N1) 2009 Virus, México” emerging Infectious Diseases. Vol. 17, No. 2, pp. 281-284.
- **Reina, J.** 2002. “Factores de virulencia y patogenicidad en las cepas gripales virus influenza tipo A) aviarias y humanas” Enferm Infecc Microbiol Clin Vol.20, No. 7. pp. 346-53
- **Russell, R. J.**, L. F. Haire, D. J. Stevens, P. J. Collins, Y. P. Lin, G. M., Blackburn, A. J. Hay, S. J. Gamblin, and J. J. Skehel. 2006. “The structure of H5N1 avian influenza neuraminidase suggests new opportunities for drug design” Nature Vol. 443 pp. 45–49.
- **Salazar M.I.**, López O.O., León A.G., Ramírez G.E., y Castro M.M. 2010. “El origen de la variabilidad genética de los virus de la influenza”. Gaceta Médica Mexicana. Vol.146. No. 3. pp. 199-207.

- **Secretaria de Salud.** 2006. “Plan Nacional de Preparación y Respuesta ante una Pandemia de Influenza” Cap. 1. Gobierno Federal. México
- **Sheu T.G.,** Deyde V.M., Okomo-Adhiambo M., Garten R.J., Xu X., Bright R.A., Butler E.N., Wallis T.R., Klimov A.I., Gubareva L.V. 2008. “Surveillance for neuraminidase inhibitor resistance among human influenza A and B viruses circulating worldwide from 2004 to 2008” *Antimicrob Agents Chemother.* Vol.52 No. 9 pp. 3284-92.
- **Shu, B.,** Balish, A., Garten, R., Smith, C., Emery, S., Barnes, J., Deyde, V., Klimov, A. y Cox, N. 2009. WHO Collaborating Center for Surveillance, Epidemiology and Control of Influenza, Influenza Division, Centers for Disease Control and Prevention. Datos en línea no publicados.
- **Spiro, D.,** Halpin, R., Bera, J., Ghedin, E., Hostetler, J., Fedorova, N., Hine, E., Overton, L., Proudfoot, K., Kim, M., Sitz, J., Katzel, D., Fan, J., Kehl, S.C., Lederboer, N., Jurgens, L.A., Bose, M.E., Beck, E.T., Kumar, S., Henrickson, K.J., Lin, X., Wentworth, D.E., Bao, Y., Sanders, R., Dernovoy, D., Kiryutin, B., Lipman, D.J. y Tatusova, T. 2010. JCVI/Medical College of Wisconsin/NCBI, National Center for Biotechnology Information. Datos en línea no publicados.
- **Spiro, D.,** Halpin, R., Bera, J., Ghedin, E., Hostetler, J., Fedorova, N., Hine, E., Overton, L., Proudfoot, K., Kim, M., Sitz, J., Katzel, D., Fan, J., Kehl, S.C., Lederboer, N., Jurgens, L.A., Bose, M.E., Beck, E.T., Kumar, S., Henrickson, K.J., Lin, X., Wentworth, D.E., Bao, Y., Sanders, R., Dernovoy, D., Kiryutin, B., Lipman, D.J. y Tatusova, T. 2010. JCVI/The Methodist Hospital Research Institute/NCBI, National Center for Biotechnology Information. Datos en línea no publicados.
- **Sullivan S.,** Jacobson R., Dowdle W, y Poland G. 2010. “2009 H1N1 Influenza” *Mayo Clin Proc.* Vol.85. No.1. pp. 64-76
- **von Itzstein M,** Wu W-Y, Kok GB, Pegg MS, Dyason JC, Jin B. 1994.“Rational design of potent sialidase-based inhibitors of influenza virus replication” *Nature* Vol. 363 No. 6428 pp. 418-423
- **Walker J.M.** 1988. *Methods in molecular biology.* Vol. 4. New nucleic acid techniques. Human Press. Clifton, New Jersey. pp. 89-116.