



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Estudios Superiores Iztacala

**Caracterización Molecular del marcador D151 del gen NA del
virus de influenza H3N2 que confiere resistencia antiviral**

Que para obtener el título de Biólogo

P R E S E N T A
Clara Noemí Martínez García

Director de Tesis: Dr. José Ernesto Ramírez González



Los Reyes Iztacala, Edo. de México, 2011



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Resumen

En el presente estudio se buscaron poblaciones heterogéneas en el marcador D151 del gen de la Neuraminidasa del virus de influenza A H3N2, el cual está relacionado con la resistencia antiviral. Se trabajó con cultivos e hisopos nasofaríngeos (HNF), a los cuales se les realizó el proceso de secuenciación capilar y pirosecuenciación para detectar si existían poblaciones heterogéneas en dicho marcador, al obtener las secuencias si se detectaron las poblaciones en ambas plataformas. Sin embargo al secuenciar las muestras de origen (HNF), no se detectó ninguna población, con lo cual se puede decir que las poblaciones se generaron durante el cultivo, ya que finalmente se realizó un pase a los cultivos que presentaron las poblaciones y se secuenciaron, observando que las poblaciones heterogéneas se conservaban en pases subsecuentes. Como conclusión se puede decir que las variantes encontradas en el marcador D151 del gen de la neuraminidasa del virus de influenza H3N2, se generaron durante el cultivo, y así mismo se conservaron en pases consecutivos, esto es de suma importancia debido a que las variantes pueden llegar a ser de interés en futuros brotes estacionales, debido a que éste se encuentra circulando actualmente y por ello está expuesto a cambios constantes, por ello es importante y necesario que al marcador se le realice un monitoreo constante, para saber si las variantes pueden llegar a adquirir resistencia o sensibilidad a los INAs.

Introducción.

La infección respiratoria aguda es la enfermedad más frecuente lo largo de toda la vida del ser humano, con variación en cuanto a su etiología condicionada, fundamentalmente, por la edad, las circunstancias medioambientales (Eiros, 2009).

Así mismo, la enfermedad respiratoria aguda causada por el virus influenza constituye una de las causas más comunes de morbilidad y mortalidad asociada a infecciones. A menudo puede ser el origen de complicaciones que comprometen la vida del paciente. La Influenza A y B causan un espectro de enfermedad similar, pero los A se asocian más frecuentemente con mayor mortalidad. En contraste, influenza C causa brotes localizados e infecciones más leves del tracto respiratorio superior (Savy ,1999).

El RNA del virus consiste de 8 segmentos de genoma cubiertos por la nucleocápside, juntos constituyen la ribonucleoproteína (RNP) y cada segmento codifica para una proteína funcionalmente importante la Polimerasa B1 (PB1),B2 (PB2), A (PA), Hemaglutinina (HA), Proteína de la nucleocápside (NP), . Neuraminidasa (NA), Proteína de la matriz (M) (M1 constituye la matriz) y la Proteína No estructural (NS) (Vega, 2007).

Los virus asociados a la influenza humana son tres ARN virus distinguidos por variaciones antigénicas en dos proteínas estructurales (la nucleoproteína y la proteína de la matriz). Con una segmentación que permite el intercambio de genes entre los virus de la influenza (Franco, 2006).

Existen varias cepas del virus de influenza A entre ellas están H1N1, H5N1, H3N2, ademásde éstas, en el 2009 surgió una nueva cepa del virus denominada A H1N1 pdm, la cual circulo durante ese año y parte del 2010, a mitad de éste, la Secretaría de Salud y la directora general del Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológica (INDRE), emitió una alerta en Tabasco por brote de Influenza Estacional H3N2, a partir de ese momento hasta estos días sigue circulando en México y en el mundo, la cepa H3N2, dejando atrás la cepa pandémica H1N1.

1. MARCO TEORICO

1.1 Historia

La enfermedad respiratoria aguda conocida ahora como influenza ha afectado a los humanos desde los tiempos antiguos. La primera pandemia ocurrió en 1580, importante por su amplia difusión y gran virulencia, así como la epidemia de 1918-1919 denominada “*flu española*”, término inapropiado que ha persistido hasta estos (Ayora, 1999).

En los años posteriores a la pandemia de 1918, se han alternado brotes epidémicos de poca importancia con otros que afectaron a zonas más extensas del mundo. En 1957 apareció un nuevo virus gripal en la provincia china de Kwichow que originó la llamada “gripe asiática” causada por el virus H2N2, la pandemia más extensa de que se tenga registro en la historia de la humanidad.

De manera similar, una nueva cepa pandémica que llegó en 1968, la llamada influenza de Hong-Kong (Figura 1), contenía un cambio a H3N2 y rápidamente sustituyó al virus H2N2 que circuló entre 1957 y 1968. Técnicas seroarqueológicas han 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 (Anónimo a, 2009).

La última pandemia registrada es la del virus A (H1N1), la cual se detectó por primera vez en los Estados Unidos en abril de 2009. Este virus fue una combinación única de genes de virus de la influenza nunca antes identificados en animales o humanos. Los genes del virus fueron una combinación de genes estrechamente relacionados con los virus de la gripe porcina H1N1 de la línea de América del Norte y los virus de la influenza porcina H1N1 de la línea de Eurasia. Debido a esto, los reportes iniciales hicieron referencia al virus como virus de influenza de origen porcino (CDC, 2010).

Durante el año 2010, aumento el número de consultas con circulación más importante de influenza A (H3N2), triplicando al virus H1N1 pandémico, se confirmaron 310 casos de infección respiratoria aguda grave (IRAG) por influenza A (H1N1) 2009, sin embargo, se observó un aumento de casos de IRA grave por influenza A (H3N2), teniendo en total 868 casos de influenza A (H3N2) (Dabanch, 2011).



Figura 1. Línea del tiempo del virus de influenza

1.2 Estructura

El virus está compuesto por una envoltura cubierta de proyecciones, que recubre una estructura proteica (nucleocápside) segmentada de simetría helicoidal. La envoltura presenta dos capas, una externa de naturaleza lipídica, derivada de la membrana citoplásmica de la célula huésped, y una capa interna, constituida por una proteína de información viral, de bajo peso molecular, que representa el 33% de todas las proteínas y comunica estabilidad al virión, se le conoce como proteína matriz o M (Anónimo b, 2007).

En la envoltura lipídica se insertan radialmente a modo de proyecciones o espículas (Figura 2), las dos glicoproteínas del virus, Existe un espacio entre la envoltura y la cápside viral en donde se encuentra la proteína matriz (M1). El centro viral lo conforma el complejo de ribonucleoproteína (RNP), que está compuesto por 8 segmentos de RNA de cadena sencilla, las proteínas PB1, PB2 y PA: polimerasa básica 1, polimerasa básica 2 y polimerasa ácida, respectivamente y la nucleoproteína (NP).

Los segmentos de RNA 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 ARN del virus, así como las señales necesarias para la encapsidación o empaquetamiento del genoma viral (Arias, 2009). De los 8 segmentos, los 3 más grandes contienen los genes que codifican para el complejo polimerasa, responsable de la replicación y la transcripción, y formado por PB2, PB1 y PA. Otros dos genes codifican las proteínas en la envoltura viral, HA y NA, las cuales juegan un rol crucial en la interacción entre el virus, la célula hospedera y el sistema inmune del individuo. Dos genes del mismo segmento codifican a dos proteínas que forman la cápside (M1 y M2). Asimismo, se encuentran otras proteínas, la ribonucleoproteína (RNP), NS1, NS2 y PB-1-F2. Teniendo como función NS1 y NS2 regular la síntesis de los componentes virales de la célula infectada, en el caso de PB1-F2, ésta es una proteína proapoptótica, sin embargo, no está presente en todos los virus Influenza A. Es importante mencionar que la actividad de la

polimerasa ARN viral es propensa al error. Por ello, la HA está sujeta a una tasa de mutación muy alta, estimada en cerca de 2×10^{-3} sustituciones de bases por posición por generación viral, o alrededor de una sustitución de bases en el gen de la HA por generación viral (Talledo, 2009).

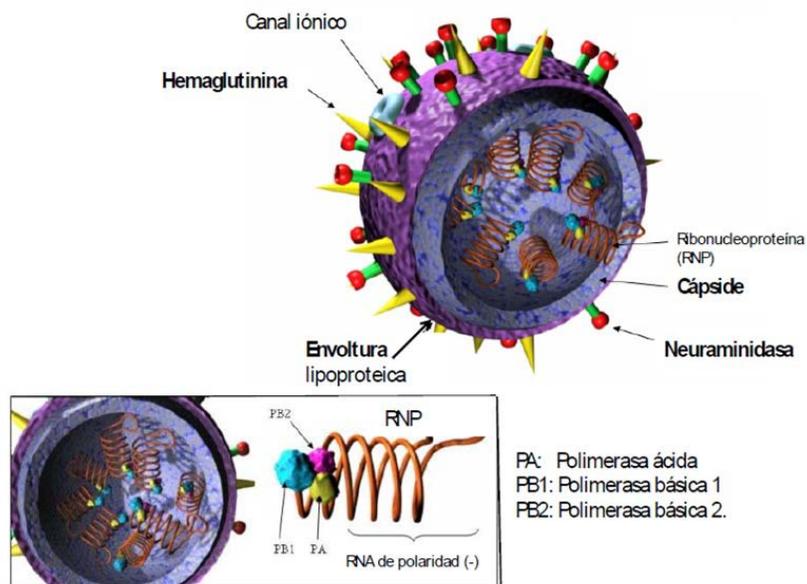


Figura 2. Estructura y partes que conforman el virus de Influenza.

En humanos, el virus normalmente ingresa al organismo por nariz o boca, e infecta las células que recubren el tracto respiratorio para iniciar la infección; el virus se une a ácidos siálicos presentes en la superficie de las células.

El ácido siálico es una molécula muy abundante en todas las células, y define el tropismo particular del virus de influenza debido a la especificidad que tienen diferentes cepas de virus por diferentes tipos de enlaces del ácido siálico con el azúcar que los precede en la cadena de carbohidratos (Figura 3). Así, los virus aislados de humanos se unen preferentemente a ácidos siálicos en unión $\alpha 2,6$ con la galactosa precedente, mientras que los virus aviáres se unen preferentemente a ácidos siálicos con unión $\alpha 2,3$.

La afinidad por este tipo de ácidos siálicos explica en parte la restricción de huésped de los virus de influenza. Además, es interesante que en las células epiteliales de

la traquea de los cerdos existen ambos tipos de enlaces del ácido siálico, lo que favorece que el cerdo pueda ser naturalmente infectado, por virus porcinos, de origen aviar y humano, lo que tiene como consecuencia, como se ha mencionado, que en esta especie animal se puedan generar frecuentemente rearrreglos genéticos que dan lugar a virus de influenza con combinaciones de segmentos génicos de diferentes orígenes (Arias, 2009).

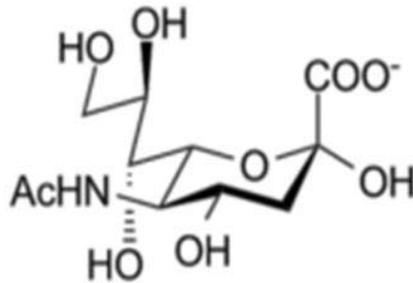


Figura 3. Estructura molecular del ácido siálico

Hemaglutinina. Como ya se mencionó, esta glicoproteína es una de las proteínas mayoritarias de la partícula viral. Es el principal antígeno de neutralización; es decir, la mayoría de los anticuerpos producidos en personas infectadas van dirigidos contra esta proteína y son capaces de neutralizar la infectividad del virus. La hemaglutinina, Promueve la adsorción viral a los receptores celulares de ácido siálico, por lo que determina el rango de especie, además es capaz de aglutinar a los glóbulos rojos o eritrocitos, propiedad que ha sido utilizada para la clasificación de los diferentes serotipos de virus (Predari *et al.*, 2010).

La hemaglutinina se sintetiza como una proteína precursora llamada HA0, que es cortada por enzimas en una región específica que contiene un aminoácido básico (lisina o arginina), para producir las proteínas HA1 y HA2, lo que resulta en la activación de la infectividad del virus. Se ha observado que, a diferencia de cepas de baja patogenicidad, las cepas altamente patogénicas tienen no sólo un residuo de lisina o arginina, sino varios

de estos aminoácidos básicos en el sitio de corte, lo que las hace particularmente susceptibles a ser cortadas y por lo tanto más infecciosas.

El corte por enzimas es esencial para la infectividad, ya que expone un péptido hidrofóbico en el extremo amino terminal de la proteína HA2 que es responsable de mediar la fusión de las membranas viral y celular. La hemaglutinina (Figura 4), además, es la principal responsable de la restricción de huésped, ya que como se mencionó anteriormente, es a través de ésta, que se reconocen los ácidos siálicos presentes en la superficie de la célula y que funcionan como receptores para el virus.

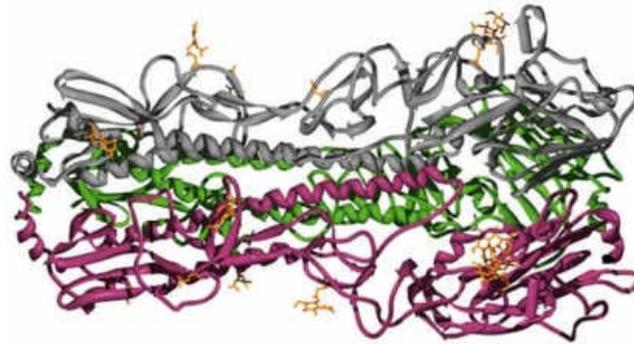


Figura 4. Molécula de la Hemaglutinina.

Neuraminidasa. Por otro lado, la glicoproteína Neuraminidasa es una sialidasa, es decir, una enzima que corta a la molécula de ácido siálico, cuya función es remover los ácidos siálicos de las glicoproteínas virales de los virus recién sintetizados, y los que están presentes en la superficie celular; ello permite la eficiente liberación del virus y el egreso viral a la célula, por lo que está implicada en la transmisibilidad viral (Predari *et al.*, 2010) (figura 5).

Esta proteína también es necesaria para remover los ácidos siálicos de la capa de mucina que recubre a las células epiteliales, lo que le permite al virus llegar a sus células blanco.

La inactivación de la actividad de la sialidasa, provoca que los virus producidos en una célula se mantengan unidos a la célula infectada y agregados entre sí, lo que inhibe su diseminación a otras células. Esta proteína es el blanco de los antivirales oseltamivir (Tamiflu) y zanamivir (Relenza), ya que son inhibidores específicos de la actividad de la Neuraminidasa (Arias, 2009).

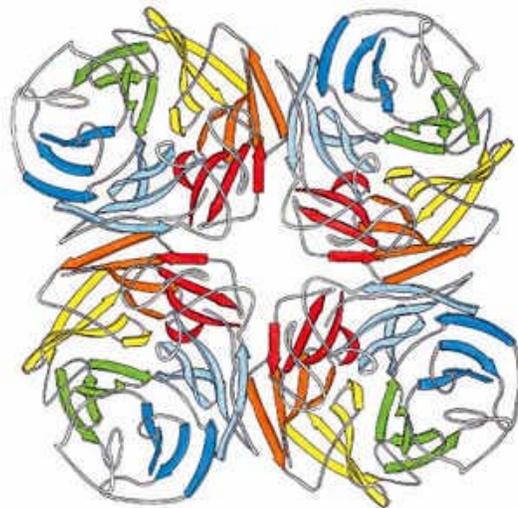


Figura 5. Molécula de la Neuraminidasa

1.3 Clasificación del virus de Influenza

La gripe se considera una enfermedad emergente, por la capacidad que tiene el virus de influenza A, de variar antigénicamente sus glicoproteínas externas y burlar así la inmunidad adquirida por la población. Esto obedece fundamentalmente a que su ácido nucleico es un ARN segmentado, el cual codifica por una ARN polimerasa que no tiene función de corregir los errores de lectura y, por lo tanto, se produce una alta tasa de mutaciones. Como ya se menciona, el genoma está dividido en 8 segmentos con capacidad de codificar para 10 proteínas virales. Esta característica muy especial le permite que dos virus diferentes puedan multiplicarse en la misma célula y se mezclen los segmentos de ARN, dando lugar a variantes con diferente virulencia para una especie dada.

El virus influenza pertenece a la familia *Orthomyxoviridae* y se clasifica en los tipos A, B y C, según las características antigénicas de sus proteínas internas (M y NP), y en subtipos, según las características antigénicas de sus dos glicoproteínas: la Hemaglutinina y la Neuraminidasa (Herrero, 2008).

La Influenza A infecta a una amplia variedad de aves y mamíferos y se dividen en subtipos. Durante el siglo pasado, estos virus causaron tres pandemias, en el caso del virus de influenza B sólo infectan a humanos y, dado que sólo existe un subtipo de ellos, tienen un bajo potencial pandémico, aunque sí pueden provocar enfermedades respiratorias serias. Por su parte, los virus de influenza C infectan a humanos y cerdos, causan enfermedades respiratorias moderadas y han sido poco estudiados (Arias, 2009).

Los tipos B y C solo infectan a los humanos, pero el tipo A afecta a varias especies: los humanos, los cerdos, los caballos, las aves de corral, las ballenas, los lobos de mar y otras. Los diferentes subtipos y variantes son especie específicos, es decir, en general atacan a una sola especie y produciendo enfermedad respiratoria.

El virus influenza A codifica 10 proteínas, dos de las cuales son glicoproteínas que se proyectan a través de la membrana fosfolípida de la partícula viral: la Hemaglutinina (H) y la Neuraminidasa (N). La proteína M1 es la que le da la estructura a la partícula y la M2 es un canal de protones que sirve para acidificar el virus con el fin de que pueda desnudarse de su cápside y liberar los segmentos de ribonucleoproteína (RNP) para que vayan al núcleo celular y sean replicados. Posee, además, tres proteínas ligadas a la RNP que tienen su función en la transcripción y la replicación del ácido nucleico viral. También contiene dos proteínas no estructurales responsables del proceso de replicación inicial (Herrero, 2008).

1.4 Replicación del virus de Influenza

Los virus influenza pueden producir infecciones productivas o no productivas. Las primeras ocurren cuando el virus se propaga en células permisivas es decir, mucosa respiratoria, células de riñón de mono o huevos embrionados. En las infecciones no productivas, el virus no cumple el ciclo total de replicación y genera virus incompletos o partículas virales no infecciosas.

Cuando un virus completo infecta células permisivas, el primer paso es la adsorción a la superficie celular. La partícula viral se adhiere a receptores celulares que contienen ácido siálico a través de la HA1. En una segunda etapa ocurre la penetración del virus a la célula para lo cual se requiere que la HA sea clivada en HA1 y HA2, y que exista pH 5 para que la capacidad de fusión sea expresada. El virus se internaliza rápidamente en el endosoma, cuando el pH desciende, la HA es clivada exponiendo el péptido de fusión. Se produce la fusión entre las membranas celular y la membrana viral que se libera de su envoltura y penetra en el citoplasma, luego se moviliza hasta el núcleo. La síntesis de ARNm requiere estimulación previa de la síntesis de ARN de la célula huésped. A continuación comienza el período de eclipse (dos horas), durante el cual no se detecta virus. Durante esta etapa temprana, el ARNm es transportado al citoplasma donde dirige la síntesis de proteínas virales.

El ARN complementario sirve como molde para la formación de ARN genómico. A las dos o tres horas post-infección se detecta ARN polimerasa dependiente de ARN y NP, alcanzando su concentración máxima a las seis horas de la infección. Las glicoproteínas HA y NA son sintetizadas en el citoplasma sobre la membrana de los polirribosomas, migran hacia la membrana celular, vía retículo endoplásmico y complejo de Golgi, y al mismo tiempo se van incorporando las cadenas laterales de los hidratos de carbono. La nucleocápside viral y la proteína M son formadas sobre polirribosomas libres. Se trasladan y se ubican en un sector interno de la membrana celular donde se encuentran las

proteínas específicas virales. No se conoce el proceso por el cual una copia de cada segmento de ARN se empaqueta en cada partícula, es probable que esto sea un evento al azar.

Los segmentos de membrana celular que contienen las HA y NA envuelven a los antígenos internos virales y se inicia la brotación, que progresa hasta que emerge la nueva partícula (Figura 7).

Los residuos de ácido siálico son eliminados de la superficie de la célula huésped por acción de la NA viral, para prevenir la reabsorción de la progenie viral, y se promueve la liberación del virus. La replicación del virus produce la muerte de la célula infectada (Mateos, 2006).

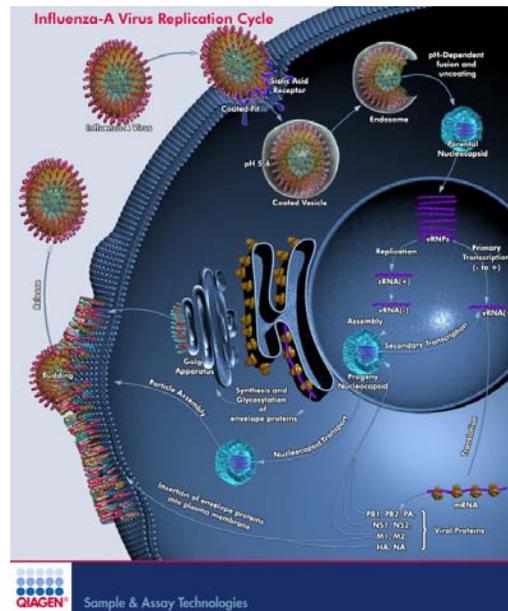


Figura 7. Ciclo de replicación del virus de Influenza. QIAGEN®

1.5 Variación antigénica

El virus de la influenza no cuenta con mecanismos de corrección de pruebas y reparación de errores que operan durante la replicación. Como consecuencia, su composición genética cambia conforme se van replicando en el hombre y en los animales, y la cepa inicial se ve reemplazada por una nueva variante antigénica.

El virus de la gripe, específicamente el virus A, pueden intercambiar o recombinar el material genético y fusionarse, provocando un cambio antigénico y como consecuencia conduce a un nuevo subtipo de virus, diferente de los dos procedentes (Anónimo b, 2007).

Los virus de la gripe sufren constantes variaciones en el tipo de proteínas H y N que presentan, lo cual les resulta útil para escapar a la respuesta inmunitaria de sus huéspedes (Arias, 2009). Este hecho es más frecuente para el virus A, con éste fenómeno se puede explicar porqué la gripe continúa siendo una enfermedad epidémica.

Las variaciones antigénicas involucran fundamentalmente a la HA y NA, las variaciones en la HA son las más importantes por ser más frecuentes, sin embargo, los anticuerpos neutralizantes están dirigidos contra estas glicoproteínas.

Se conocen dos tipos de variaciones antigénicas producidas por mecanismos diferentes y que afectan la HA y NA: 1 variaciones menores o fluctuaciones antigénicas (*drift*) y 2 las variaciones mayores (*shift*).

El virus de la influenza tiene dos mecanismos diferentes de variación antigénica, lo que les permite infectar a sus huéspedes en más de una ocasión y causarles la enfermedad, este tipo de variaciones se conocen como *deriva* y *cambio antigénicos*.

1.5.1 Variaciones menores: se producen gradualmente cada 2 o 3 años dentro de un subtipo de influenza. Cada subtipo se denomina por su HA o NA. Estos

cambios son el resultado de la selección de mutantes que tienen alteraciones en la secuencia de aminoácidos de los péptidos de HA o NA, causadas por mutaciones puntuales en el ARN virales. Estos cambios, aunque menores, son suficientes para no ser reconocidos por los anticuerpos.

Se produce una selección inmunológica, es decir nuevos virus con poca variación antigénica.

1.5.2 Variaciones mayores: han sido descritas sólo para influenza A. Son cambios súbitos y dramáticos producidos en los genes que codifican para la HA y NA. Son virus nuevos para los cuales la población no tiene ningún recuerdo inmunológico. Estas son las cepas que causan las mayores pandemias, son ejemplos de ello los cambios de estructura de H1N1 a H2N2 en 1957 y de H2N2 a H3N2 en 1968. El virus humano influenza tipo A H1N1 aislado por primera vez en 1933, circuló hasta 1957, año en que se produjo el primer cambio mayor detectado en los antígenos de superficie. En 1968 aparece el virus H3N2 y en 1977 reaparece el H1N1, desde entonces hasta la fecha coexisten cepas de influenza A H1N1 y H3N2. Hay varias hipótesis que tratan de explicar estas variaciones:

a) Entrecruzamiento o reordenamiento genético entre virus influenza humana y no humana, en especial los de origen aviario. Los virus B y C no muestran variaciones, quizás debido a que existen pocos virus semejantes en animales.

b) Que se hayan acumulado mutaciones puntuales y que en un momento se manifiesten como variaciones mayores (Mateos, 2006).

1.5.3 La deriva antigénica resulta de los cambios en las proteínas causados por mutaciones puntuales (cambios en nucleótidos) en los genes. Este tipo de mutaciones se generan constantemente y se acumulan en los genes de las proteínas H y N, lo que hace necesario que se cambie la composición de la vacuna estacional que se fabrica cada año.

1.5.4 *Cambio antigénico* el cual se ve favorecido por la naturaleza segmentada del genoma de estos virus. Esta característica del genoma viral facilita que cuando dos subtipos diferentes de virus infectan a un mismo animal, los genes de ambos virus puedan mezclarse y producirse así nuevos virus con combinaciones de proteínas H y N diferentes a las de los virus originales, esto se puede apreciar en la figura 8.

Se piensa que este tipo de intercambio de genes entre virus de diferentes especies animales ocurre principalmente en los cerdos, ya que a diferencia de las aves y los humanos, que generalmente sólo son infectados por virus de influenza A de origen aviar y humano, respectivamente, los cerdos sí se pueden infectar con virus de origen aviar, humano y, por supuesto, porcino. Así, cuando un cerdo se infecta al mismo tiempo con dos virus de diferentes especies, por ejemplo de patos y humanos, se convierte literalmente en un recipiente de mezclado de genes, en el cual pueden generarse virus nuevos (Arias, 2009).

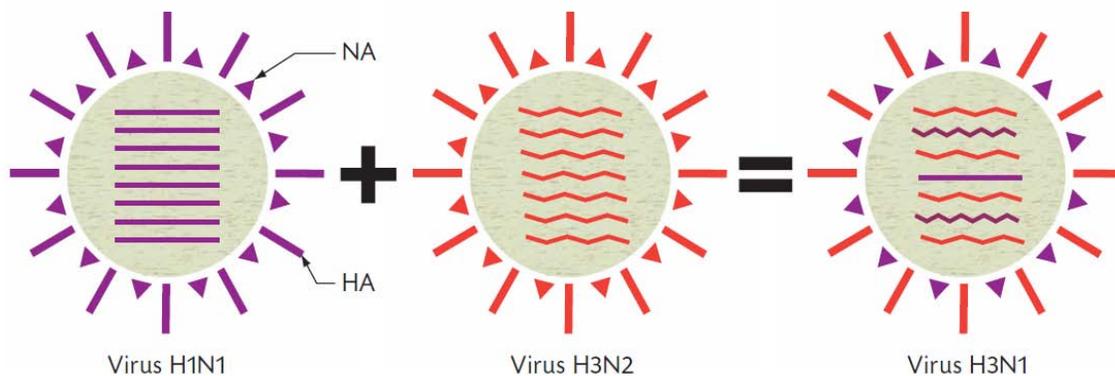


Figura 8. Intercambio de genes entre dos subtipos del virus de Influenza A

1.6 Infecciones por el virus de Influenza A H3N2

La influenza es una enfermedad que afecta una parte importante de la población mundial, con epidemias estacionales, generalmente invernales. El virus gripal de ciertos subtipos del tipo A, ya sea H1N1, H1N2 o H3N2, circula entre los humanos y provocan epidemias anuales de gripe.

Durante la temporada de influenza 2010-2011, los virus más frecuentes en los informes fueron los de influenza A (H3N2) (CDC, 2011). El número de casos de influenza, en el mes de enero del año en curso, se incrementó un 25 por ciento y está dentro de lo esperado, no es como en el momento de la epidemia, se habla que más del 90 por ciento de ellos han sido H3N2 (estacional) y el resto de H1N1.

Es importante mencionar que el virus H3N2 sigue predominando y está mutando constantemente, aún sigue circulando aunque de manera menos severa el virus pandémico A/H1N1.

En el CDC indican también que durante el año 2007, el contagio humano con un nuevo virus de influenza A se convirtió en una condición de declaración obligatoria a nivel nacional. Las infecciones con el nuevo virus influenza A incluyen todas las infecciones humanas con el virus de influenza A que son diferentes de los virus de influenza humana H1 y H3 que circulan actualmente. Estos virus incluyen aquellos que se clasifican en subtipo como no humanos en su origen (CDC, 2011).

Debido a que todos los subtipos de Influenza se encuentran en reservorios de aves acuáticas y silvestres se hace imposible su erradicación, por ello la prevención y control son las únicas metas realistas. Por lo tanto, si los humanos, cerdos y los pájaros acuáticos son los principales vectores asociados en la transferencia inter especies de este virus y de la aparición de nuevas pandemias humanas, la vigilancia de la gripe en estas especies se impone (Grill, 2011).

1.7 Antivirales para el tratamiento de Influenza A

Desde hace algunos años se dispone de antivirales contra el virus de influenza, la primera generación de antivirales fueron los adamantanos, amantadina y rimantadina, los cuales son activos contra el virus de influenza A, después de éstos, se desarrollaron los inhibidores de influenza, de los cuales dos se encuentran disponibles actualmente, el oseltamivir y zanamivir (Bonvehí, 2009, Okomo-Adhiambo, 2010a) sin embargo el zanamivir, a diferencia de oseltamivir, se le ha recetado con menos frecuencia debido a las limitaciones actuales de su uso. Estos medicamentos inhiben la enzima neuraminidasa del virus, una proteína involucrada en la separación de la partícula viral desde la superficie celular luego del proceso replicativo (Fica, 2001).

El mecanismo de acción de los antivirales contra influenza se lleva a cabo en el proceso replicativo del virus, y para que éste se lleve a cabo, requiere la acción fundamental de dos glicoproteínas que se encuentran en su superficie. Una es la HA, la cual es la responsable de la unión del virus a receptores de las células huésped que contienen ácido siálico, lo que hace posible la fragmentación de los residuos de ácido siálico terminales de las glucoproteínas (Bonvehí, 2009).

Oseltamivir. Es un antiviral, inhibidor de la neuraminidasa, empleado para el tratamiento y la prevención de la gripe. En contraposición a amantadina y rimantadina que poseen actividad frente a influenza A solamente, oseltamivir tiene actividad contra influenza A y B.

En los años 1999 y 2000, la FDA aprobó oseltamivir para el tratamiento y prevención de infecciones sin complicaciones debido a virus influenza A o B, en adultos, adolescentes y niños mayores de 1 año.

El tratamiento con oseltamivir debe comenzarse dentro de las 48 horas posteriores al comienzo de los síntomas gripales, ya que no hay evidencia que avale la eficacia de

oseltamivir en tratamientos comenzados luego de este período. De modo que oseltamivir no es considerado un sustituto de la vacuna antigripal anual.

Zanamivir. Antiviral, inhibidor de la neuraminidasa, empleado al igual que el oseltamivir para el tratamiento de la gripe. En 1999 la FDA aprobó zanamivir para el tratamiento de infecciones sin complicaciones debido a virus influenza A o B. Sin embargo, hasta el momento zanamivir no tiene aprobación de la FDA para la prevención de la gripe. El zanamivir también tiene actividad contra influenza A y B.

El tratamiento con zanamivir debe iniciarse dentro de las 48 horas posteriores al comienzo de los síntomas gripales. La seguridad y eficacia de zanamivir en niños menores de 7 años no ha sido establecida (Caffaratti, 2004).

La función de los INAs es bloquear la acción de esta glicoproteína, evitando la fragmentación o división de uniones de ácido siálico, impidiendo la liberación de las nuevas partículas virales evitando de esta forma, la diseminación de la infección viral a otras células del huésped.

Es importante mencionar que la interferencia sobre la función de esta enzima impide la separación de la nueva progenie viral desde las células a las cuales están adheridas por unión de hemaglutinina viral-ácido siálico de la mucosa y su diseminación. Debido a que esta enzima está presente tanto en el virus influenza A como en el B, estos inhibidores poseen un amplio espectro de acción (Fica, 2001).

1.8 Resistencia Antiviral en H3N2

Al hablar de resistencia antiviral, se hace referencia cuando un virus ha cambiado de tal manera que el medicamento antiviral es menos eficaz para tratar o prevenir la enfermedad. Actualmente en Estados Unidos, cuatro medicamentos antivirales están aprobados por la FDA para utilizar contra la influenza: amantadina, rimantadina, zanamivir (Relenza) y oseltamivir (Tamiflu). Los medicamentos adamantanos (amantadina y rimantadina) están aprobados para la influenza A mientras que los medicamentos inhibidores de la neuraminidasa (zanamivir y oseltamivir) están aprobados para la influenza A y B (CDC, 2011).

Existen estudios en los que se ha probado la resistencia o sensibilidad del gen de la Neuraminidasa del virus de influenza, a los medicamentos anteriormente mencionados, a continuación se muestran algunos de ellos:

McKimm, y colaboradores en 2003, realizaron un análisis de secuencias de la neuraminidasa obtenidas de aislamientos clínicos así como las susceptibilidades de los virus de la influenza al Oseltamivir y Zanamivir, obteniendo un mayor número de variaciones en el residuo D151, tales como G/V/N y E.

En el 2006, Yen *et al.*, realizaron un estudio en el que caracterizaron residuos conservados de la NA que no se han asociado con la resistencia a los inhibidores de la Neuraminidasa en el subtipo N2. Estudiaron las mutaciones R118K, R371K, E227D, D151E, R152K, R224K, y E276D.

Sheu *et al.* en 2008, realizaron una prueba con los inhibidores de la NA, encontrando en cinco virus de la estación 2004 a 2007, valores extremos de mutaciones en residuos conservados del sitio activo de la NA. Así mismo, en cuatro virus más de Influenza A (H3N2) contenían V o A en el residuo 151. De las cuales de D151 con N, G, E, o V, a excepción de A, ya fueron previamente reportadas para el tipo A y B.

Ramírez, *et al.* en 2011, analizaron un total de 692 muestras clínicas del virus de influenza pandémica (H1N1) de pacientes mexicanos (452 sobrenadantes de cultivos celulares y muestras de hisopado nasofaríngeo 199), en donde evaluaron la sensibilidad a los medicamentos, detectando en una muestra de un niño tratado con oseltamivir, la sustitución H275Y en el gen de la Neuraminidasa, la cual confirió resistencia a oseltamivir pero sensibles a zanamivir.

Deyde y colaboradores en 2009, realizaron un estudio utilizando el proceso de pirosecuenciación para detectar los cambios en D151 en la enzima de la NA, trabajando con hisopos nasofaríngeos y cultivos celulares. Detectando cambios en el marcador molecular D151.

Makoto, *et al.* en 2010 trabajaron con secuencia del virus de influenza A (H3N2), en las que encontraron cambios de aminoácidos en el marcador molecular D151 en el cultivo celular.

También en el 2010b, Okomo y colaboradores realizaron un análisis con pirosecuenciación de la susceptibilidad a los INA's en virus de influenza A (H3N2) encontrando que todos los virus A (H3N2) fueron sensibles a oseltamivir. En el análisis de las secuencias se detectó la presencia de la mutación D151V. La mayoría de los virus (H3N2) fueron sensibles a zanamivir. Las mutaciones que se presentaron en las secuencias fueron D151G y D151D/G. Los datos de secuencia disponibles para nueve de estos virus se observó la presencia de secuencias de tipo silvestre y mutante en el residuo 151 de la NA, en 6 aislamientos se encontró la mutación D151D/G, en 2 se encontró la D151D/N y en uno solo se encontró la D151D/A.

Orozovic *et al.* en 2011 realizaron un estudio en el que investigaron si los mutantes existentes en la población silvestre de virus de influenza A son resistentes a los

inhibidores de la NA. Hicieron un análisis de las mutaciones que están relacionadas con la resistencia a oseltamivir y zanamivir entre ellas la mutación D151; encontrando que las secuencias del subtipo N2 de la especie porcina contenían mutantes; específicamente en el virus H3N2 encontraron siete mutantes.

Existen métodos para probar la resistencia a los inhibidores de la neuraminidasa, en los que se realizan análisis de secuencias para identificar cambios en la enzima, sin embargo el análisis de resistencia a estos nuevos medicamentos se complica más debido a la especificidad de los marcadores moleculares que confieren resistencia y además por la relevancia clínica (Deyde, 2010).

La neuraminidasa posee un sitio activo enzimático que está dirigido por los inhibidores. Por lo tanto, los virus con baja sensibilidad a estos medicamentos pueden surgir como resultado del consumo de éstos y/o por una variación genética natural en la NA. La emergencia de la resistencia a los medicamentos se acompaña de un aumento en la concentración del fármaco necesaria para inhibir la actividad enzimática de los mutantes en comparación a la necesaria para el virus de tipo *wild-type* (Sheu, 2008).

Las mutaciones más comunes que ocurren en el virus de influenza A estacional, son H274 (N1), E119 (N2), R292 (N2), N294 (N2) y D151 (N1 y N2). (Deyde, 2010). Es importante mencionar, que los marcadores que confieren resistencia a esta nueva clase de medicamentos, aún no está bien definida, y la relevancia clínica de algunas mutaciones sigue siendo incierta. Cabe mencionar que las mutaciones identificadas en la NA de los virus en presencia de inhibidores, varía en función del tipo antigénico NA/ subtipo y el medicamento, por esto que el monitoreo a los inhibidores de la NA.

1.9 Métodos para la detección de marcadores moleculares que confieren resistencia a inhibidores de neuraminidasa.

Los métodos para la identificación de resistencia a los antivirales en virus de la influenza se dividen en genotípicos y fenotípicos (Deyde, 2010); los primeros se basan en la identificación de mutaciones (marcadores moleculares) en los genes MA y NA las cuales confieren resistencia antiviral, en los segundos se detecta la actividad enzimática en presencia del inhibidor.

Los métodos genotípicos nos permiten identificar mutaciones o variantes en un fragmento de cierto gen del virus. 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.

Estudios recientes han demostrado que mutaciones localizadas a lo largo del sitio activo en este gen NA pueden alterar la susceptibilidad de los virus a los INA's. Los principales marcadores (sustituciones aminoacídicas) asociados a resistencia en el virus AH3N2 se encuentran ubicados en los sitios E119, D151, R292, N294 del este gen.

Para detectar la presencia de estos marcadores es necesario obtener la secuencia nucleotídica de un fragmento del Gen NA donde se encuentran localizados estas marcadores. La principal estrategia para obtener esta secuencia nucleotídica es utilizando el método de PCR (reacción en cadena de la polimerasa) que permite la amplificación exponencial de una molécula de ADN (De Necochea, 2004), generando millones de copias del fragmento de interés, el cual se utiliza como molde para la secuenciación automatizada por el método de Sanger mediante una electroforesis capilar.

El método de Sanger se basa en el uso de la ADN polimerasa para sintetizar cadenas de ADN con una terminación específica. Con este método se generan fragmentos

de ADN de todos los tamaños posibles que se puedan distinguir entre sí, por el tipo de marcaje que llevan o por la incorporación de un terminador específico.

También es posible detectar estos marcadores utilizando la plataforma de pirosecuenciación, en la cual se realiza el análisis del fragmento específico donde se encuentran los marcadores. Esta plataforma es una nueva tecnología de secuenciación de DNA, que se basa en la secuenciación por síntesis, acoplado la síntesis de DNA a una reacción quimioluminiscente, lo que permite una rápida determinación de secuencias en tiempo real.

A raíz de los eventos ocurridos en el 2009 con el ingreso de la Cepa pandémica de Influenza A H1N1, en el laboratorio de Genoma de Patógenos del InDRE, se han desarrollado ambas plataformas (Secuenciación Capilar y Pirosecuenciación) para la vigilancia activa de la detección de los marcadores moleculares que confieren resistencia antiviral al virus de la Influenza A (H1N1, H1N1pdm, H3N2 y H5N1).

2. Justificación

Nuevas variantes de los virus de influenza resultan por cambios antigénicos debido a mutaciones puntuales que ocurren durante la replicación del virus. La capacidad del virus de la influenza A y B de sufrir cambios antigénicos en la neuraminidasa, da como resultado la resistencia a los antivirales. Actualmente el virus de Influenza A H3N2 se ha reportado en más del 95% de la población como sensible a los inhibidores de la NA (INAs), oseltamivir y zanamivir, sin embargo no ocurre lo mismo con el virus de Influenza estacional H1N1, el cual en menos de tres años el 100% de esta población viral se convirtió en resistente a los INAs. En el virus de la influenza A H3N2, se han reportado cuatro cambios en el gen NA que resultan ser resistentes a antivirales tales como R119, R292K, N294S y D151. Estudios en el laboratorio nos han permitido detectar en aislamientos virales de Influenza A H3N2 la presencia de mezcla de nucleótidos (G/A) en el codón que codifica para el marcador D151 del gen NA, implicado en la resistencia antiviral. Por lo anterior resulta justificado y de gran interés realizar un análisis molecular del marcador D151 del gen NA del virus de Influenza A H3N2 con la finalidad de determinar cuáles y cuantas variantes se encuentran en este marcador, dilucidar si la presencia de estas variaciones es por selección de estas o por nueva generación durante el cultivo celular y finalmente si las variantes detectadas son capaces de prevalecer después someter al virus a un nuevo pase celular.

3. Objetivos

3.1 Objetivo General

Caracterizar molecularmente el marcador D151 del gen que codifica a la Neuraminidasa del virus de Influenza A H3N2 el cual está implicado en la resistencia antiviral

3.2 Objetivos Particulares

Determinar las diferentes poblaciones heterogéneas en el marcador D151 del gen NA de extractos de RNA provenientes de sobrenadante de cultivo celular infectado con el virus de influenza H3N2 mediante secuenciación capilar

Verificar la presencia de las poblaciones heterogéneas detectadas capilarmente por medio de la plataforma de pirosecuenciación.

Conocer si las poblaciones heterogéneas se seleccionan o se generan durante el proceso de infección en cultivo celular mediante la detección de estas poblaciones en las muestras que dan origen a los cultivos celulares (HNF)

Comprobar si las variantes en el marcador D151 de la NA se mantienen presentes durante pases consecutivos de los cultivos celulares.

4. Material y Métodos

El ARN del virus de Influenza A H3N2 utilizado se obtuvo de muestras clínicas (hisopos) y cultivos celulares por parte del laboratorio de Genoma de Patógenos del Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológica (InDRE). Se realizó extracción por medio del Robot MagNa Pure LC 2.0 System y el estuche Total Nucleic Acid Isolation Kit de Roche.

4.1 RT-PCR. Para el proceso fue necesario realizar una mezcla de reacción para el número de muestras a trabajar según el siguiente protocolo (considerando también los controles positivo y negativo).

Tabla 1. Reactivos de mezcla de reacción utilizada para el RT-PCR

Reactivo	$\mu\text{l}/\text{rxn}$
Agua PCR	5
Buffer 5x	12.5
Iniciador F (10pmol/ μl)	1
Iniciador R (10pmol/ μl)	1
RT/Taq mix	.5

Al tener la mezcla de reacción se colocó 20 μl de ésta más 5 μl del extracto de ARN en el tubo eppendorf correspondiente, en seguida se colocaron cada una de la muestras en el termociclador GeneAmp PCR System 9700 de Applied Biosystems y se inició el proceso.

4.2 Cuantificación. Al terminar el PCR se cuantificaron los productos obtenidos en un DNA Chip en el Bioanalyzer Agilent Technologies, obteniendo su tamaño y la concentración.

4.3 Secuenciación. Después de haber cuantificado cada uno de los productos, se les realizó secuenciación capilar, iniciando con el proceso de purificación enzimática (ExoSAP-IT) de productos de PCR. Por cada 5µl de producto de PCR se agregó 0.5 µl de la ExoSAP-IT, se incubó a 37°C por 15 minutos y 15 minutos más se inactivó la enzima a 80°C como se muestra en la siguiente figura.

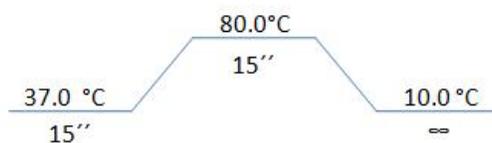


Figura 12. Protocolo para purificación enzimática.

El siguiente proceso es la reacción de secuencia, ésta es una variante del método de Sanger o también conocido como método terminal, donde los dideoxiterminales están marcados cada uno con un fluorocromo diferente, los cuales emiten fluorescencia a diferentes longitudes de onda, que permiten diferenciar cada base nucleotídica terminal. En la reacción de secuencia se agregó a cada tubo la siguiente mezcla con los siguientes reactivos:

Tabla 2. Mezcla de reacción utilizada en la purificación enzimática.

Reactivo	cantidad
Terminator Ready Reaction Mix (BigDye 3.1v)	3µl
Primer (3.3 pmol/µl)	1µl
Buffer de Secuenciación 5x	2µl
DNA molde (templado)	50-100 ng
DNA de cadena sencilla	200-500 ng
DNA de doble cadena	1-100 ng
Producto de PCR (100-2000 pb)	1-100 ng
H2O grado biología molecular	Ajustar a 20µl

Finalmente se colocaron los tubos en un termociclador y llevar a cabo la reacción de secuenciación por 40 ciclos de acuerdo a las siguientes condiciones:

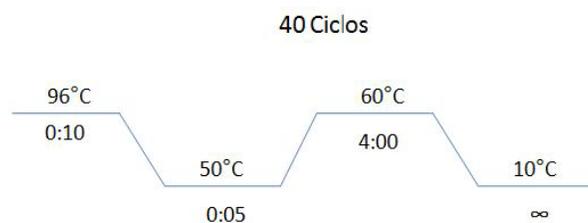


Figura13. Protocolo utilizado para la reacción de secuencia.

El siguiente paso para la secuenciación capilar es la purificación por placa de 96 pozos CentriSep, en donde se centrifugó una placa de 96 pozos a 3000 rpm durante 3 minutos, para eliminar el líquido de hidratación, después se colocaron cada una de las muestras en el centro del pozo correspondiente y nuevamente se centrifugó a 3000 rpm durante 3 minutos, una vez transcurridos los minutos necesarios, se selló la placa una septa de 96 pozos y se colocó en el termociclador durante 5 minutos a 95°C, para abrir cadenas, después de los 5 minutos, se colocó la placa en hielo por 2 minutos, para mantener las cadenas abiertas, posteriormente se colocó la placa en el secuenciador 3130xL y se inició la corrida. Finalmente, se obtienen los electroferogramas del software del equipo, para su posterior edición.

4.4 Pirosecuenciación. El proceso se inició con la preparación de un amplicon biotinilado (templado) por medio de RT-PCR, usando el kit Invitrogen Superscript III One step RT-PCR HiFi Taq system a partir de un extracto de RNA del virus de influenza H3N2. Al obtener el templado se verificó la banda esperada en un gel de agarosa al 2% (E-Gel).

Para el proceso de pirosecuenciación fue necesario preparar una solución de Binding Buffer y perlas (sefarosa y estreptavidina) se alicuotaron 60µl de ésta y 20 µl del producto de PCR en una placa de PCR 96. En seguida se colocó la placa en el vortex, mínimo durante 15 minutos

Del mismo modo se preparo y el Annealing Buffer con el primer de secuencia, y se alicuoto 40 µl en una placa PSQ.

El proceso continuo en el work station, en él se colocaron bandejas de plástico con etanol, solución de desnaturalización, buffer de lavado 1x y agua desionizada.

Al finalizar el tiempo requerido en el vortex se colocó la placa en el work station al igual que la placa PSQ. En seguida se colocó el prep tool en la placa de PCR, que con ayuda de una bomba se captaron las perlas con el amplicon unido. Con la bomba aun encendida, se transfirió el prep tool a la bandeja donde está el etanol, la solución de desnaturalización, el buffer de lavado 1x y el agua desionizada. Después se colocó en la placa y se movió en forma circulatoria dentro de la placa para liberar las perlas con el templado.

Se colocó la placa (PSQ96) en el soporte para el termobloque durante 4 minutos, transcurridos los 4 minutos, se quitó el soporte del termobloque y se dejó enfriar por 10 minutos, finalmente se quitó la placa del soporte y se dejó enfriar por 4 minutos más, para terminar la reacción de alineación.

En seguida, se reconstituyó la enzima (E) y el sustrato (S) con agua Milli Q. Para el análisis de 96 muestras, se agregaron 600µl de E y S, y 400 µl de dNTPs, en el pozo correspondiente del cartridge. Finalmente se colocó la placa PSQ96 del templado (DNA) y el primer de secuencia así como el cartridge en el PyroMark™ ID y se inició la corrida. Al finalizar la corrida, se recolectaron los datos del software.

5. Resultados y Discusión

Se realizó un RT-PCR al extracto de RNA proveniente de sobrenadante celular de 50 cultivos infectados con el virus de influenza H3N2 utilizando los iniciadores 333 Forward (Fw) y 914 Reverse (Rv). Se obtuvo un amplicon de 582 pb correspondiente a un fragmento del gen que codifica para la Neuraminidasa (NA) del virus de influenza H3N2, dónde se encuentran ubicados los marcadores que confieren resistencia a oseltamivir (E119, R292K, N294S y D151). Los Productos se verificaron y se cuantificaron en el sistema Agilent 2100 en un DNA CHIP 1500.

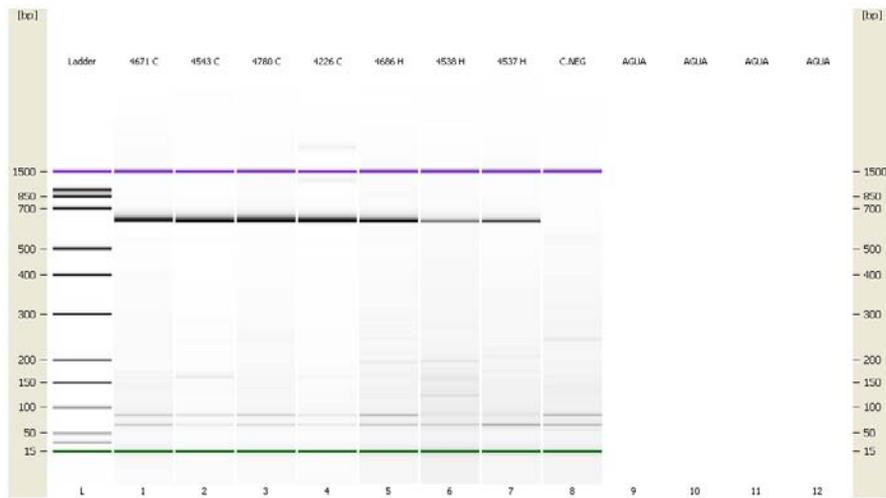


Figura 14. Verificación y cuantificación del producto de PCR donde se muestra la banda esperada de 582pb.

Después de haber cuantificado los productos de PCR, se realizó la secuenciación capilar, con los iniciadores 151Fw y 151 Rv. Los electroferogramas obtenidos nos indican que 32 secuencias (64%) presentaron el codón GAT (“wild type”) el cual codifica para ácido aspártico (D) en la posición 151 (D151) indicando con ello que estos aislados son sensibles a los INAs. Por otra parte, se encontró la presencia de poblaciones heterogéneas (A/G = R) en este codón en los 18 cultivos restantes (figura 15). Lo anterior se muestra cuando en un electroferograma se observan dos o más picos de diferentes nucleótidos en la misma posición, en este caso, donde los nucleótidos presentes en la misma posición son Adenia (A) y Guanina (G), se denominan con la letra “R” de acuerdo con la nomenclatura oficial para las bases degeneradas.

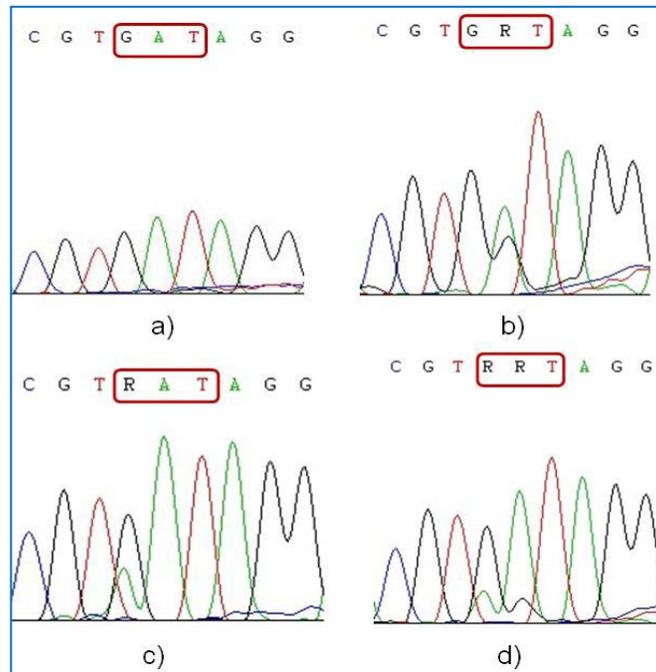


Figura 15. Electroferogramas de la secuencia de un fragmento del gen NA del Virus de Influenza A H3N2. a) Secuencia “wild type” donde se observa el codón GAT presente en 32 cultivos, b) Variante A, donde se observa la presencia de poblaciones heterogéneas en el 2do nucleótido del codón GAT (GRT); c) Variante B presentando cambio en el 1er nucleótido del codón GAT (RAT), y c) Variante C que muestra doble cambio en el 1ro y el 2do nucleótido del codón GAT (RRT).

A continuación se muestra la lista de cultivos que presentaron las tres variantes con presencia de poblaciones heterogéneas, así como el cambio de aminoácidos que presentó en el residuo D151.

Tabla 3. Listado de cultivos que presentan poblaciones heterogéneas

Cultivo	Codon 151	Variante	Sustitución
32 cultivos	GAT	<i>Wild Type</i>	D151
4226	GRT	Variante A	D151 D151G
5189			
4619			
4668			
5505			
4537			
4671			
4674			
4680			
4686			
4810			
4538			
4907			
7042	RAT	Variante B	D151 D151N
4264			
4835			
4553	RRT	Variante C	D151 D151G/N/S
4780			

El análisis molecular confirmatorio para la búsqueda de marcadores moleculares que confieren resistencia antiviral para el virus de la Influenza se realizan utilizando la plataforma de pirosecuencia con el sistema BIOTAGE de acuerdo a los protocolos establecidos por los CDC. Con la finalidad de verificar la presencia de las poblaciones heterogéneas de los cultivos observadas en electroforesis capilar, se confirmó la presencia de éstas mediante el proceso de pirosecuenciación con el sistema PyroMark Q96 ID.

Se obtuvo la pirosecuencia de tres cultivos representativos de las variantes GRT y RAT (4226 (GRT), 5189(GRT) y 7042 (RAT).

En la pirosecuencia obtenida del cultivo 4226 se observa la presencia de una doble Guanina (G) indicada con el número 2 por encima de la letra G; una de estas bases corresponde al primer nucleótido del codón 151 y la otra corresponde a la segunda posición de este codón, en mezcla con la Adenina (A), obteniéndose entonces las dos poblaciones nucleotídicas en las segunda posición del codón de interés "GRT", comparado con la pirosecuencia obtenida de la cepa "wild Type" la cual no presenta la doble "G" . Figura 16.

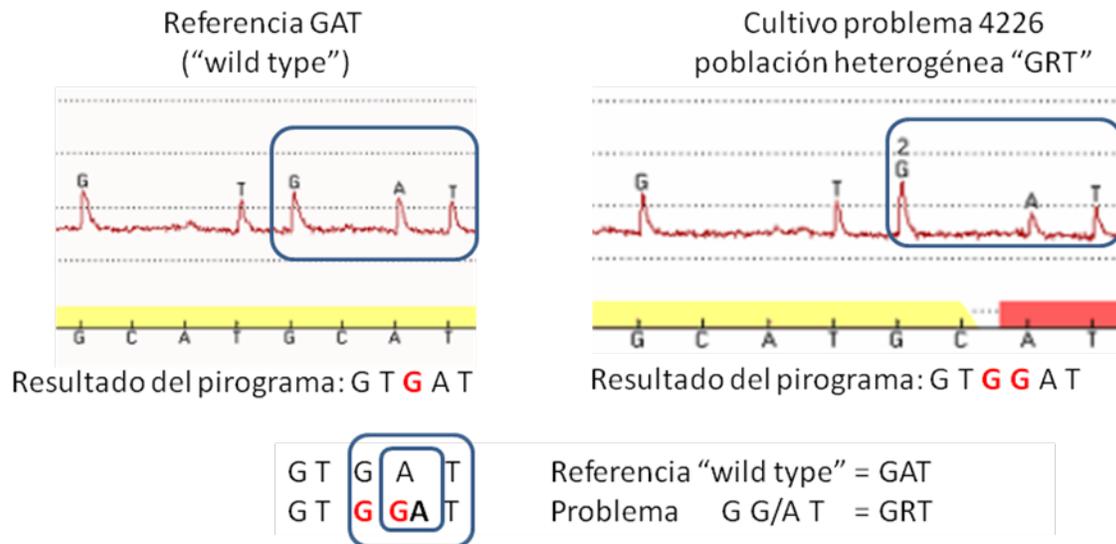


Figura 16. Pirogramas obtenidos de un cultivo "wild type" y del cultivo problema 4226.

En la figura 17 se observa el cultivo 5189, que coincide con el cultivo 4226, ya que también se observa la presencia de una doble Guanina (G) indicada con el número 2 por encima de la letra G; una de estas bases corresponde al primer nucleótido del codón 151 y la otra corresponde a la segunda posición de este codón, en mezcla con la Adenina (A), obteniéndose entonces las dos poblaciones nucleotídicas en las segunda posición del codón de interés "GRT", comparado con la pirosecuencia obtenida de la cepa "wild Type" la cual no presenta la doble "G" . Figura 17.

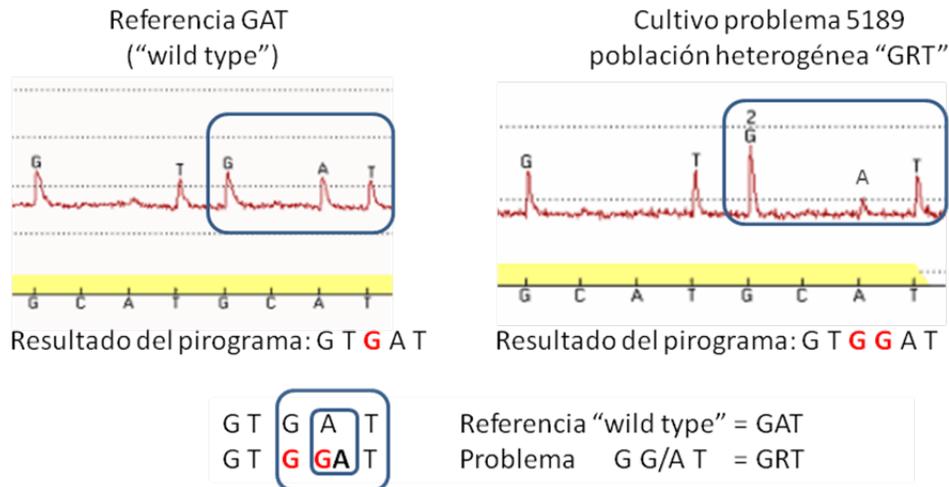


Figura 17. Pirograma de cultivo "wild type" comparado con el cultivo problema 5189.

Por otro lado en el cultivo 7042 se observa la presencia de una doble Adenina (A) indicada con el número 2 por encima de la letra A; una de estas bases corresponde al primer nucleótido del codón 151 y la otra corresponde a la segunda posición de este codón, en mezcla con la Guanina (G), obteniéndose entonces las dos poblaciones nucleotídicas en las segunda posición del codón de interés "GRT", comparado con la pirosecuencia obtenida de la cepa "wild Type" la cual no presenta la doble "A". Figura 18.

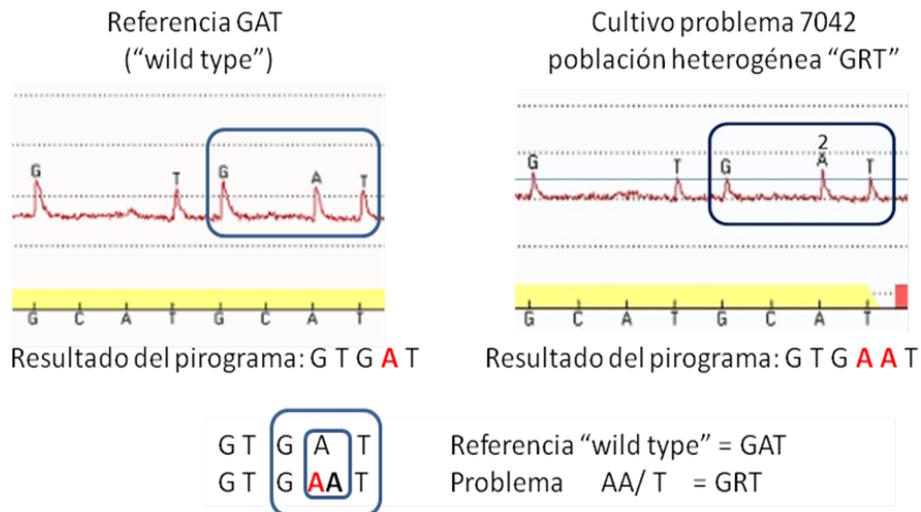


Figura 18. Pirograma de cultivo "wild type" comparado con el cultivo problema 5189.

Debido a que las secuencias presentaron poblaciones heterogéneas, nos dimos a la tarea de investigar si las muestras iniciales, que dan origen a los cultivos, presentaban las poblaciones heterogéneas por lo tanto se trabajó con las muestras de hisopo nasofaríngeo de las 18 muestras que presentaron estas poblaciones o variantes, y se realizó nuevamente el proceso de secuenciación.

A continuación se muestran los electroferogramas de los cultivos y sus muestras de origen, en ellas se puede observar claramente que en los hisopos no hay población heterogénea en el marcador D151 (GAT).

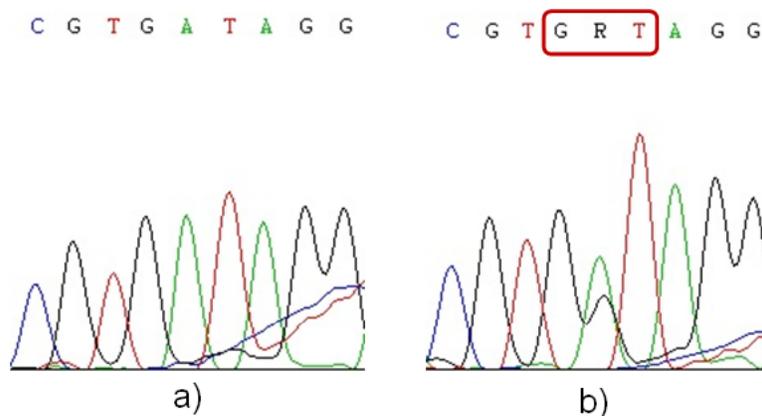


Figura 19. a) Muestra de origen (4226) sin cambio, b) Cultivo (4226) presentando el cambio **GRT**

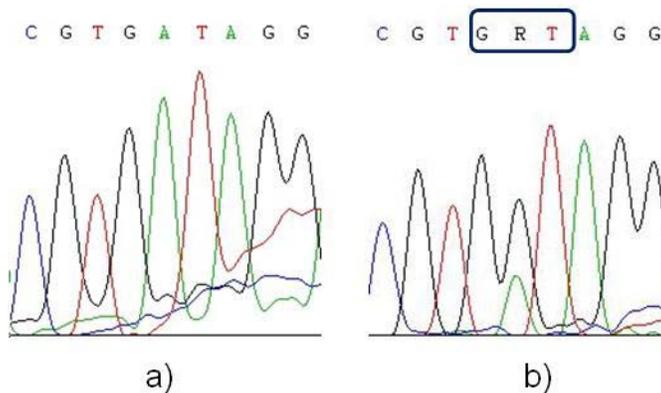


Figura 20. a) Muestra de origen (5189) sin cambio, b) Cultivo (5189) mostrando cambio (**GRT**)

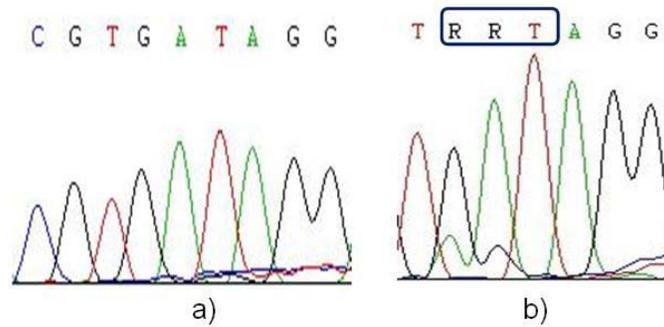


Figura 21. a) Hisopo en el que no se detecta ningún cambio, b) Cultivo 4780 las poblaciones heterogéneas.

Con los resultados obtenidos de los hisopos nasofaríngeos se verificó que el cambio o las poblaciones heterogéneas no eran de origen, con lo que se puede pensar que las poblaciones probablemente se están generando en los cultivos, esto se puede comparar y explicar con lo reportado por McKimm, *et al.* en 2003, los cuales realizaron un análisis de secuencias de la neuraminidasa obtenidas de aislamientos clínicos así como las susceptibilidades de los virus de la influenza al Oseltamivir y Zanamivir, obteniendo un mayor número de variaciones en el residuo D151, tales como G/V/N y E, en la cual se coincide con el cultivo 5189 (Figura 20) que presenta un cambio de aminoácido, obteniendo la variación D151G. Los cambios de aminoácidos en D151 por N o E en H1N1 y A, G, E, N o V en H3N2, han sido reportados que muestran una baja sensibilidad los inhibidores de la Neuraminidasa.

Siete años más tarde, Makoto, *et al.* trabajaron con secuencia del virus de influenza A (H3N2), en la que encontraron cambios de aminoácidos en la posición D151/ A, G, E, N o V en el cultivo celular. Makoto y colaboradores sugieren que estos cambios se deben a que el cultivo celular juega un posible rol en la selección de la variante D151.

Es importante mencionar que las mutaciones en el residuo D151 que han sido previamente detectadas en el virus influenza A, exhiben una disminución en la sensibilidad a los inhibidores de la NA, oseltamivir y zanamivir. En el año 2009, Deyde y colaboradores, realizaron un estudio utilizando el proceso de pirosecuenciación para detectar los cambios en D151 en la enzima de la NA. Coincidiendo con sus resultados ya que solo detectaron cambios de (D151E) en los cultivos, mientras que en las muestras que dan origen a los cultivos no las detectaron. Deyde y colaboradores sugieren que esto se debe a un posible rol del cultivo celular en la selección de variantes de la NA, las cuales pueden alterar la susceptibilidad a los inhibidores de la NA.

Un año más tarde, Okomo *et al.* realizaron un análisis con pirosecuenciación de la susceptibilidad a los IN en virus de influenza A (H3N2) encontrando que todos los virus A (H3N2) fueron sensibles a oseltamivir. En el análisis de las secuencias se detectó la presencia de la mutación D151V. La mayoría de los virus (H3N2) fueron sensibles a zanamivir. Las mutaciones que se presentaron en las secuencias fueron D151G y D151D/G. Los datos de secuencia disponibles para nueve de estos virus se observó la presencia de secuencias de tipo *wild type* y mutante en el residuo 151 de la NA, en 6 aislamientos se encontró la mutación D151D/G, en 2 se encontró la D151D/N y en uno solo se encontró la D151D/A. Okomo y colaboradores hacen referencia a que las mutaciones en el residuo D151 de la NA están asociados con la sensibilidad reducida a zanamivir en A (H3N2) sin embargo, afirman que los cambios en el D151 son normalmente derivados de los cultivos celulares y que no están presentes en las muestras clínicas, esto ayuda a explicar y a comparar el porqué las poblaciones heterogéneas solo se presentan en los cultivos, nuevamente se coincide con los autores, ya que en las muestras de origen que se trabajaron aquí, no se encontró ningún cambio.

Al obtener los resultados de las muestras de origen, no se detectó ningún cambio, por lo tanto se realizó un segundo pase a los 18 cultivos que presentaron las poblaciones. Obteniendo como resultado nuevamente la presencia de poblaciones heterogéneas en el pase subsecuente.

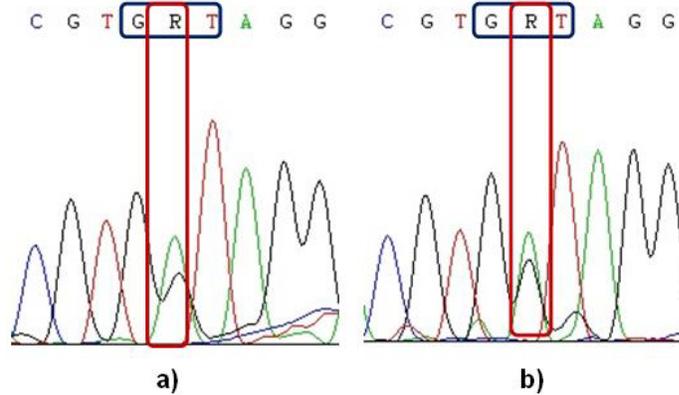


Figura 22. Comparación de a) cultivo con el b) segundo pase, en donde se muestra que las poblaciones se mantienen.

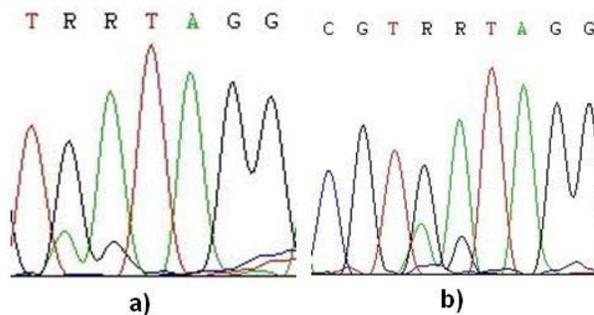


Figura 23. Comparación de a) cultivo (4780) con el b) segundo pase, en nuevamente se presentan las poblaciones heterogéneas.

En el 2011, Orozovic *et al.*, realizaron un estudio en el que investigaron si los mutantes existentes en la población *wild type* de virus de influenza A son resistentes a los inhibidores de la NA. Hicieron un análisis de las mutaciones que están relacionadas con la resistencia a oseltamivir y zanamivir entre ellas la mutación D151; encontrando que las secuencias del subtipo N2 de la especie porcina contenían mutantes; específicamente en el virus H3N2 encontraron siete

mutantes. Los autores explican que la variante D151 en el gen de la NA del virus de influenza A de la especie aviar, no es parte de una variación natural, sin embargo, este evento se puede dar debido a una presión de selección. De acuerdo a esto, se puede pensar que las poblaciones heterogéneas que se muestran en los electroferogramas tanto de los cultivos iniciales como en los países puedan ser efecto de una presión de selección.

Sin embargo, Yen *et al.* en 2006, realizaron un estudio en el que caracterizaron residuos conservados de la NA que no se han asociado con la resistencia a los inhibidores de la Neuraminidasa en el subtipo N2. Entre ellos el residuo D151E, reportando que éste, cuenta con variaciones naturales (G / V / N / E) las cuales se han identificado en el subtipo N1 y N2, así como en el virus influenza B con una gran escala de susceptibilidad a los INA, lo que sugiere que el residuo D151 puede no ser tan conservado como se pensaba anteriormente. En cuanto a la sensibilidad a los INA y la actividad de la NA, se observó que el residuo D151 reduce la sensibilidad al oseltamivir, finalmente los autores indican que el residuo D151 es una variación natural.

Un estudio de mutagénesis, la mutación D151E en la N2 de la NA reduce la sensibilidad a oseltamivir. Con esto es evidente, que se necesitan más estudios para asegurar el posible efecto del cambio en la posición 151 en la susceptibilidad *in vivo*. Sin evidencia de la emergencia de mutaciones en la posición 151 en pacientes tratados, sin sustituciones en la posición 151 no se puede clasificar como resistente a los INA (Sheu, 2008).

Es importante mencionar que el diseño de los inhibidores de la NA está basado en la estructura conservada del sitio activo de la NA. Éstos inhibidores, como se menciono anteriormente, interrumpen el ciclo de replicación del virus evitando la liberación del virus a la célula infectada y puede interferir con la iniciación de la infección, además de que las mutaciones en las zonas conservadas no sólo determinan una disminución de su actividad catalítica, sino que además, y es un factor que hay que tener en cuenta, modifican el equilibrio o balance funcional entre la neuraminidasa y la hemaglutinina en el proceso de la replicación viral. Así mismo, los inhibidores interactúan con múltiples residuos, los cuales interactúan bajo presión selectiva; en el sitio activo de la NA, es por esto que es de gran importancia detectar si los cambios que se han encontrado en estas muestras son reales o no. Para ello se puede emplear la secuenciación masiva paralela, en la que se secuencian genomas completos y puede ayudar a detectar la presencia de cuasiespecies.

6. Conclusiones

- Mediante la secuenciación capilar se logró determinar tres variantes que se presentan en poblaciones heterogéneas en el codón D151 del gen NA extractos de RNA provenientes de sobrenadante de cultivo celular infectado con el virus de influenza H3N2: A)GRT B)RAT C)RRT
- Con la plataforma de pirosecuenciación se verificó la presencia de cada una de las poblaciones heterogéneas detectadas en el marcador D151 del gen NA mediante secuenciación capilar.
- Se observó y se verificó por secuenciación capilar, que las poblaciones heterogéneas se generaron durante el proceso de infección en cultivo celular ya que en las secuencias de las muestras de origen (HNF) éstas no se presentaron.
- Finalmente se pudo comprobar mediante secuencia capilar que las variantes en el marcador D151 de la NA se mantuvieron en los pases consecutivos de los cultivos celulares.
- Las variantes encontradas en el marcador D151 del gen de la neuraminidasa del virus de influenza H3N2, pueden llegar a ser de interés en futuros brotes estacionales, debido a que éste se encuentra circulando actualmente y por ello está expuesto a cambios constantes, por ello es importante y necesario que al marcador se le realice un monitoreo constante, para saber si las variantes pueden llegar a adquirir resistencia o sensibilidad a los INAs.

Prospectivas

Sería conveniente realizar un análisis del gen de la neuraminidasa del virus de la influenza H3N2, mediante pirosecuenciación masiva paralela para detectar la presencia de poblaciones heterogéneas o cuasiespecies, y de ser así determinar si éstas confieren o no resistencia a los INAs, así como pruebas fenotípicas para determinar si estas afectan o no al virus.

7. Literatura Citada

1. Anónimo a, 2009. www.dgepi.salud.gob.mx. 2010.
2. Anónimo b, 2007. www.cucs.udg.mx. 2011
3. Arias, F. C. y López, S. 2009. Anatomía del virus de la influenza A/H1N1-2009. Ciencia.
4. Ayora, T. G. 1999. Influenza: Historia de una enfermedad. Biomed. Vol. 10. pp 57-61.
5. Bonvehí, P. E. 2009. Antivirales contra el virus de la influenza. CEDECEM.
6. Caffaratti, M. y Briñón, M. C. 2004. Oseltamivir y Zanamivir: Nuevos antivirales para el tratamiento de la gripe. España.
7. CDC. 2010. La pandemia de gripe H1N1 2009: resumen de Abril de 2009 a Abril de 2010.
8. CDC, 2011. <http://espanol.cdc.gov/enes/flu/about/qa/antiviralresistance.htm>. Febrero de 2011.
9. CDC, 2011. <http://espanol.cdc.gov/enes/flu/pastseasons/> . Junio de 2011.
10. Dabanch, J., Perret, C., Wilhelm, J. P., Fasce, R., Sotomayor, V. Vergara, J., Otaíza, F., Del Campo, S., Rivera, M. 2011. Guía clínica para el diagnóstico y manejo clínico de casos de Influenza. Chile.
11. Deyde, M. V., Sheu, G. T., Trujillo, A. A., Okomo-Adhiambo, M., Garten, R., Klimov, A. I. and Gubareva, 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. Mar. p. 1102-1110.

12. Deyde, M. V., Sheu, Okomo-Adhiambo, M., . Sheu, T. G., Wallis, T. R., Fry, A., Dharan, N., Klimov, L.V., Gubareva, L. V. 2009. Pyrosequencing as a tool to detect molecular markers of resistance to neuraminidase inhibitors in seasonal influenza A viruses. *Antiviral Research*. No. 81. p. 16-24.

13. Eiros, J. M., Ortiz, R. de L., Tenorio,A., Casas, I., Pozo, F., Ruiz, G y Pérez, B. P . 2009. Diagnostico microbiológico de las infecciones virales respiratorias. *Enfermedades Infecciosas Microbiología Clínica*. 27(3):168-177. España.

14. FluNet,2011.http://www.who.int/csr/disease/influenza/2011_01_28_GIP_surveillance/en/index.html. Julio 2011.

15. Fica, C. A. 2001. Influenza: Una revisión de su quimioprofilaxis y terapéutica antiviral. *Rev Chil Infect*; 18 (2): 127-131.

16. Franco, P. C., Rodríguez, M. A. J., Santos, P. J. I. 2006. Aspectos clínicos y epidemiológicos de la influenza. *CIMEL* Vol. 11 Nº 1.

17. Grill, F. 2001. Influenza: Una enfermedad emergente. Uruguay.

18. Herrero, U. L. 2008. El virus de influenza y la gripe aviar. *AMC*, vol 50 (1).

19. Mateos, S. 2006. Temas de Bacteriología y Virología Médica. 2ª. FEFMUR. Uruguay. Pp 673.

- 20.** McKimm-Breschkin, J., Trivedi, T., Hampson, A., Hay, A., Klimov, A., Tashiro, M., Hayden, F. and Zambon, M. 2003. Neuraminidase Sequence Analysis and Susceptibilities of Influenza Virus Clinical Isolates to Zanamivir and Oseltamivir. Vol. 47, No. 7. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, p. 2264–2272.
- 21.** Makoto, U., Shimabukuro, K., Mochizuki, K., Masatsugu, O., Kageyama, T., Shirakura, M., Kishida, N., Yamashita, K., Horikawa, H., Kato, Y., Fujita, N., Tashiro, M., Odagiri, T. and the Working Group for Influenza Virus Surveillance in Japan. 2006. Oseltamivir-Resistant Influenza Viruses A (H1N1) during 2007–2009 Influenza Seasons, Japan. Vol. 16, No. 6.
- 22.** Okomo-Adhiambo, M., Sleeman, K., Ballenger, K., Nguyen, H. T., Mishin, V.P., Sheu, T. G., Smagala, J., Yan Li, Klimov, A. and Gubareva, L. V. 2010a. Neuraminidase Inhibitor Susceptibility Testing in Human Influenza Viruses: A Laboratory Surveillance Perspective. *Viruses* , 2, 2269-2289; doi:10.3390/v2102269
- 23.** Okomo-Adhiambo, M., Nguyen, T. H. Sleeman, K., Sheu, G., T. Deyde, M. V., Garten, J. R., Xiyang Xu, Shaw, W. M., Klimov, A. I., Gubareva, L. V. 2010b. Host cell selection of influenza neuraminidase variants: Implications for drug resistance monitoring in A (H1N1) viruses. *Antiviral Research*. 85 381–388.
- 24.** Orozovic, G., Orozovic, K., Lennerstrand, J., Olsen, B. 2011. Detection of Resistance Mutations to Antivirals Oseltamivir and Zanamivir in Avian Influenza A Viruses Isolated from Wild Birds. *Plos One*. Vol. 6. U.S.A. pp. 10.
- 25.** Predari, S. C., Costantini, P. E., Famiglietti, A., Sordelli, D., Foccoli, M., Natiello, M., Sánchez, J., Cáceres, J., Bratanich, A. C., Cavallaro, L., Martínez, P. L. A., Oubiña, J. R. 2010. Nueva Gripe A (H1N1) causada por el virus pandémico Influenza A (H1N1) 2009. Comité de emergencias biológicas de la red. Argentina.

- 26.** Ramírez, G. J. E., González, D. E., Alcántara, P. P., Wong, A. C., Olivera, D. H., Cortez, O. I., Barrera, B. G., Ha Nguyen, Gubareva, L. López, M. I., Díaz, Q. J. A., Lezana, F. M. A., López, G. R. H., Córdova, V. J. A., Hernández, A. M. y Alpuche, A. C. 2011. Oseltamivir-Resistant Pandemic (H1N1) 2009 Virus, Mexico. *Emerging Infectious Diseases*. Vol. 17, No. 2.
- 27.** Vega Barrientos RS. y Reyes-Terán G. 2007. El virus de la Influenza. *Neumología y cirugía de tórax*, Vol. 66, S1
- 28.** Savy, L.V., Baumeister, G. E., Pontoriero, V. A. 1999. Estudio antigénico de cepas de influenza a (H3N2) circulantes en la Argentina y su relación con las cepas vacúnales. *MEDICINA. Argentina*. 59: 225-230.
- 29.** Sheu, G.T., Deyde, V. M., Okomo-Adhiambo, M., Garten J. R. Xu, X. Bright, A. R., Bulter, N. E., Wallis, R. T, Klimov, I. A. y Gubareva, V. L. 2008. Surveillance for Neuraminidase Inhibitor Resistance among Human Influenza A and B Viruses Circulating Worldwide from 2004 to 2008. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. p. 3284–3292 Vol. 52, No. 9.
- 30.** Talledo, M. y Zumaeta, K. Los virus Influenza y la nueva pandemia A/H1N1. 2009. *Rev. peru. biol.* 16(2): 227 – 238.
- 31.** Yen, Hui-Ling, Hoffmann, E., Taylor, G., Scholtissek, C., Monto, A. S., Webster, R. G. Govorkova, E. A. 2006. Importance of Neuraminidase Active-Site Residues to the Neuraminidase Inhibitor Resistance of Influenza Viruses. *Journal of Virology*. Vol. 80, No. 17. p. 8787–8795.