



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD
ANIMAL
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

Análisis del genoma del virus de influenza
A/pollo/México/2007(H5N2)

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

PRESENTA:
Giovanni Steffani Hernández

Tutor: Gary García Espinosa (FMVZ-UNAM)

Comité tutorial: Elizabeth Loza Rubio (POSGRADO EN CIENCIAS DE LA
PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL)

Edith Rojas Anaya (POSGRADO EN CIENCIAS DE LA
PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL)

MÉXICO, D.F. NOVIEMBRE 2014



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.

Dedicatoria

A mis padres por el amor y apoyo incondicional que me brindaron para la realización y culminación de este trabajo. LOS AMO.

Felipe, además de ser mi hermano eres mi mejor amigo y compañero de vida, porque siempre has estado cuando te he necesitado.

A Lety, por su cariño, compañía, charlas, alegrías y consejos que me impulsaron a salir adelante.

A Xóchitl, Jorge y Dora por su tiempo, comprensión y palabras de aliento que me ayudaron en aquellos momentos difíciles.

Agradecimientos

Al Dr. Gary García por la oportunidad, paciencia, consejos y enseñanzas para la realización y culminación de este trabajo.

A mi comité tutorial:

Dr. Gary García Espinosa.

Dra. Elizabeth Loza Rubio.

Dra. Edith Rojas Anaya.

A Fernando Chávez Maya por su apoyo y consejos y enseñanzas.

A mi jurado:

Dr. José Álvaro Aguilar Setien

Dr. José Iván Sánchez Betancourt

Dr. Gary García Espinosa

Dra. Alejandra León Cruz

Dr. Luis Padilla Noriega

Al CONACYT, por la beca que me otorgó para la realización de mis estudios de maestría, dentro del programa de Maestría y Doctorado en Ciencias de la Producción y Salud Animal.

El análisis del genoma del virus de influenza A/pollo/México/2007(H5N2) fue financiado por el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación tecnológica (PAPIIT) con número de registro IN216212.

INDICE

Dedicatoria.....	I
Agradecimientos	II
Índice	III
Resumen	1
1.0 Introducción	2
1.1 Estructura	2
1.2 Genoma	6
1.3 Mutaciones	8
2.0 Planteamiento del problema	9
2.1 Situación en México	10
3.0 Justificación y delimitación de la investigación	11
3.1 Justificación práctica	11
4.0 Hipótesis	12
5.0 Objetivo de la investigación	12
5.1 objetivo general	12
5.2 objetivos específicos	12
6.0 Material y métodos	12
6.1 análisis de secuencias	12
6.2 análisis filogenético	13
6.3 traducción de secuencias	14

7.0 Resultados	15
7.1 similitud entre secuencias	15
7.2 distancia genética entre poblaciones	18
7.3 Dendogramas	22
7.4 Genoma y proteínas	31
7.5 Sitios de glicosilación	32
7.6 Especificidad de especie	32
7.7 Resistencia a los antivirales	32
7.8 Factores de virulencia	33
8. Discusión	34
9. Referencias bibliográficas	38

Abreviaturas

ARN	Acido ribonucleico
ARNm	Acido ribonucleico mensajero
ARNv	Acido ribonucleico viral
HA	Hemoaglutinina
IABP	Influenza aviar de baja patogenicidad
IAAP	Influenza aviar de alta patogenicidad
M1	Proteína de matriz uno
M2	Proteína de matriz dos
NA	Neuraminidasa
NP	Núcleo proteína
NS1	Proteína no estructural uno
NS2	Proteína no estructural dos
PA	Polimerasa ácida
PB1	Polimerasa básica uno
PB2	Polimerasa básica dos
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
RT	Transcriptasa reversa

Resumen

El virus de la influenza aviar subtipo H5N2 de baja patogenicidad ha estado presente en las unidades de producción avícola de México desde 1994. Actualmente su presencia es esporádica con algunos focos al año en algunos estados de la Republica Mexicana. Durante una evaluación de virulencia en embrión de pollo y pollos libres de patógenos específicos (SPF) de varias cepas de influenza aviar, donadas por la Comisión México – Estados Unidos para la prevención de la fiebre aftosa y otras enfermedades exóticas de los animales (CPA) de la SAGARPA, se observó que una cepa del virus aislada de pollo, mataba al 75% de los embriones de pollo, pero causaba signos clínicos de baja virulencia en pollos SPF. El presente estudio tuvo por objetivo, determinar si los ocho segmentos del genoma corresponden a un virus de influenza aviar de pollo para comprender su origen filogenético. Se realizó un análisis de las características moleculares de este virus a partir de la secuencia completa del genoma de los 8 segmentos del virus amplificados por RT-PCR punto final y la secuencia de nucleótidos se llevo a cabo por el método de Sanger. La distancia genética fue calculada utilizando el modelo de Kimura para 2-parámetros, y el análisis evolutivo se elaboró en el programa MEGA5. Los dendogramas se realizaron utilizando el método de Neighbor-Joining del programa bioinformatico MEGA5. Los resultados del análisis filogenético del virus muestran que los ocho segmentos del genoma del virus tienen un linaje mexicano con virus aislados en pollos. La secuencia de aminoácidos que presenta el virus en el sitio de corte de la molécula Hemoaglutinina (HA), es característica de cepas de virus de influenza aviar de baja patogenicidad. Al realizar el análisis filogenético, se demostró que los ocho genes de este virus A/pollo/Mexico/2007(H5N2) están relacionados con los virus de influenza aviar H5N2 de baja patogenicidad del sur del país, así como con los virus aislados de Guatemala y El Salvador.

1 INTRODUCCIÓN

El virus de la influenza aviar pertenece a la familia *Orthomyxoviridae*, la cual está formada por 5 géneros: *Influenzavirus A*, *Influenzavirus B*, *Influenzavirus C*, *Thogotovirus* e *Isavirus*. El género *influenzavirus A* podría estar conformado por 198 subtipos con base en la combinación de las 18 hemoaglutininas (HA) y 11 neuraminidasas (NA) (1). En aves silvestres se encuentran las 16 HA y 9 NA, pero los principales subtipos presentes en aves acuáticas silvestres son el H3, H4 y H6, mientras que en las *Galliformes* han sido el H5, H7 y H9.

1.1 GENOMA

El genoma del *Influenzavirus* tipo A está formado por ocho segmentos de RNA de cadena sencilla de polaridad negativa, con tamaños que van de 890 a 2350 nucleótidos que incluyen algunas variaciones dependiendo de la cepa de virus; en total, el genoma tiene aproximadamente 13,600 nucleótidos y puede codificar hasta doce proteínas virales. La mayoría de los segmentos codifican para una sola proteína, con excepción de los segmentos 2, 3, 7 y 8. En algunas cepas el segmento 2 codifica la proteína PB1 y PB1-F2, el segmento 3 codifica para la PA y PA-X, el segmento 7 codifica para la proteína de matriz 1 y 2; y el segmento más pequeño codifica para las proteínas no estructurales NS1 y NS2 (cuadro 1). Todos los genes virales tienen en sus extremos 5' y 3' regiones no traducidas

de longitudes variables, que contienen las señales de unión para la RNA polimerasa del virus, así como las señales necesarias para la encapsidación del genoma viral. Los últimos 13 y 12 nucleótidos de los extremos 5' y 3', respectivamente, están altamente conservados entre todos los genes del virus (2, 3, 4, 5).

Cuadro 1. Longitud en nucleótidos de cada uno de los ocho segmentos del virus de influenza aviar y la proteína que codifican.

Segmento y proteína que codifica.	# Nucleótidos	# Aminoácidos
1.-PB2	2341	759
2.-PB1 y PB-F2	2341	757 y 87
3.-PA y PA-X	2233	716 y 252
4.-HA	1778	566
5.-NP	1565	498
6.-NA	1413	454
7.-M1 y M2	1027	252 y 97
8.-NS1 y NS2	890	230 y 121

1.2 PROTEINAS ESTRUCTURALES Y NO ESTRUCTURALES

El virus de la influenza tipo A es pleomórfico, sus dimensiones pueden variar entre 80 y 120 nm de diámetro, el cual está envuelto por una membrana de origen celular que contiene tres proteínas, la hemoaglutinina (HA), neuroaminidasa (NA) y la M2 que son proteínas de origen viral (6). En la parte interna están presentes las proteínas del complejo de polimerasa PB1, PB2 y PA, además de la proteína de nucleocapside NP y la proteína de matriz M1.

Además de las proteínas estructurales, los virus de influenza tipo A codifican para las proteínas no estructurales PB1-F2, PA-X, NS2 y NS1.

Polimerasa básica 2 (PB2)

Es una proteína que está relacionada en el reconocimiento del “Cap” presente en el extremo 5’ del ARN celular, la cual es utilizada como iniciador de la transcripción del ARNm. También se ha visto que tiene que ver con la capacidad de ciertos virus influenza para replicarse en células aviares y de mamíferos. Además se ha observado que el residuo del aminoácido 627 en la subunidad PB2 regula la actividad de la polimerasa, participando en la carga de la superficie y la estructura de este dominio para la replicación del virus y su adaptación (7, 8).

Polimerasa básica 1 (PB1)

Esta proteína participa en el proceso de iniciación y elongación del ARNm que tiene interacción con sitios específicos conservados del ARN viral, a través de las subunidades

localizadas en sus extremos amino y carboxilo terminal (9). La proteína polimerasa básica 1 (PB1) se une a las regiones, que controlan el inicio de la transcripción del ARNv y ARNc, y contiene la característica conservada de los ARN polimerasas, para funcionar como una subunidad catalítica de la polimerasa, y responsable de la adición secuencial de nucleótidos a las cadenas de ARN naciente (8).

Polimerasa Básica 1- F2(PB1-F2)

Esta proteína no está presente en todos los virus de influenza tipo A. La proteína tiene una afinidad por la membrana interna de la mitocondria, lo que traerá la consiguiente pérdida de potencial de membrana promoviendo la apoptosis, principalmente de los macrófagos (10, 11).

Polimerasa ácida (PA)

Esta proteína es una fosfoproteína con actividad endonucleasa que realiza un corte en la porción 5' del ARNm del hospedero que contiene la porción CAP y además esta metilado, conformado por 13-15 nucleótidos, el cual es un molde iniciador para la replicación de ARNv (3, 12). También se ha reportado que la proteína polimerasa acida (PA) está involucrada en la transcripción del genoma del virus y es necesaria para que el complejo de replicación del virus sea funcional (13, 14).

Polimerasa acida X (PA-X)

El segmento 3 del virus contiene un segundo marco de lectura abierto, el cual codifica para esta proteína ('X-ORF). Esta pequeña proteína provoca la inhibición de la expresión

de ARN polimerasa II, cuya función es la de traducir el ADN hacia ARNm. Por lo que la PA-X afecta la expresión de los genes anfitriones requeridos para la respuesta de las células, por lo que la proteína aumenta la patogenicidad del virus (12).

Hemoaglutinina (HA)

La HA se proyecta desde la membrana lipídica de la cubierta viral, como una espícula de aproximadamente 10 a 40 nm que; está distribuida uniformemente en toda la superficie de la envoltura del virión. La HA participa en la adsorción y penetración del virus a la célula, estimula la fusión entre la membrana de la célula hospedera y la envoltura viral; y aglutina a los eritrocitos a través de la HA1 (6). La proteína es sintetizada como una sola proteína precursora, HA0, que en el retículo endoplásmico se trimeriza y se glicosila, para ser transportada a la superficie celular (15). La proteína HA contiene múltiples enlaces disulfuro y se escinde en una forma madura compuesta de dos subunidades, HA1 y HA2 (12, 16). La subunidad HA2 y las porciones amino y carboxilo terminales de la subunidad HA1 forman una tallo-membrana proximal que media la fusión de la membrana durante la entrada viral (17). El dominio de unión al receptor (HA-RBD, por sus siglas en inglés), forma la cabeza distal de la molécula y se inserta en la subunidad HA1 que junto con la subunidad HA2 son producto del corte proteolítico de la HA. Durante la entrada del virus, el HA-RBD interacciona con receptores que contienen ácido siálico en la superficie de la célula hospedadora, y el virión es posteriormente internalizado por endocitosis a la célula (18).

Ribonucleoproteína (RNP)

La proteína RNP forma una estructura de varillas flexibles; sus filamentos presentan una forma de tirabuzón en un extremo y una periodicidad de alternar surcos de mayor a menor, lo que sugiere que la estructura está formada por una cadena que se pliega sobre sí mismo y luego se enrolla sobre sí para formar una especie de doble hebra en la hélice. Grandes estructuras helicoidales, sugieren que está formado por la agregación ordenada de los segmentos más pequeños, a veces se han visto parcialmente interrumpidas en los viriones (19).

La RNP consta de cuatro tipos de proteínas y ARN. La NP es la subunidad predominante de la nucleocápside y se asocia con el ARNm con una periodicidad de alrededor de 20 nucleótidos de ARN por cada subunidad NP. El complejo RNP dependiente de ARN consta de las tres subunidades (PB1, PB2 y PA) que están presentes en sólo 30 a 60 copias por virión (9). El ARN en el complejo RNP sigue siendo sensible a la digestión por ARNasa, y puede ser desplazado por polivinilsulfato. Las proteínas de la polimerasa en el complejo RNP pueden llevar a cabo la unión con el CAP, endonucleasa, la síntesis de ARN y las reacciones de poliadenilación (20).

Neuraminidasa (NA)

La glicoproteína neuraminidasa se extiende desde la membrana viral como una proyección o espícula formada por una cabeza cuadrangular; cataliza el anclaje de las uniones entre el ácido siálico terminal y un residuo azucarado adyacente en la membrana celular que permite transportar al virus a través de las mucinas y destruir los receptores de la HA

sobre la célula hospedera, permitiendo la elución de la progenie viral de la célula infectada (21, 16). La NA también previene la agregación viral evitando la unión con su propia HA (22, 23).

Proteína M1

Se cree que la proteína de la matriz viral (M1) es la base de la bicapa lipídica de la envoltura viral, y al mismo tiempo, esta proteína se encuentra asociada con el ARN genómico y con la nucleoproteína (NP), que en asociación estrecha con los ARN virales forman la ribonucleoproteína del virus. La proteína M1 es la más abundante en el virión y participa como regulador en el movimiento intracelular de la RNP y ayuda en la homo-oligomerización del genoma viral (6, 24).

Proteína M2

La proteína de membrana M2 está presente en la envoltura viral, se encuentra anclada en la envoltura viral por su región hidrofóbica. La proteína M2 se expresa abundantemente en la membrana plasmática de células infectadas por el virus, pero es muy escasa en los viriones, ya que sólo unas pocas moléculas se incorporan a las partículas virales. En las células infectadas, la proteína M2 se expresa en la superficie celular apical. Esta proteína funciona como canal iónico que se activa gracias al ambiente ácido del endosoma, el cual permite la entrada de protones al interior de la envoltura viral ocasionando la acidificación del interior del virión y disociación de la interacción electrostática entre la proteína M1 y las ribonucleoproteínas, ocasionando la salida de la RNP al citoplasma celular (25).

Proteína NS2

La proteína NS2 (nombrada como la segunda proteína codificada por el segmento de RNA 8 que también codifica para la proteína NS1) está presente con 130 a 200 moléculas por virus y forma una asociación con la proteína M1. Esta asociación se cree que es fundamental en la replicación del virus en relación a la exportación del complejo RNP del núcleo al citoplasma. Se ha sugerido que NS2 cambie de nombre por el de NEP para la proteína de exportación nuclear (11, 14, 26).

Proteína NS1

Esta proteína inhibe la poliadenilación del ARNm celulares para restringir la actividad antiviral inducida principalmente por el interferón, ya que impide el reconocimiento celular del RNA viral por el “sensor” celular RIG-1 uniéndose directamente, y así bloquear la actividad de las proteínas celulares PKR y CPSF30 (13, 4). También se ha descrito que esta proteína participa en el tráfico de los viriones, por lo tanto es esencial para la replicación viral (27, 28).

1.3 MUTACIONES

El virus de la influenza tipo A tiene una tasa de mutación estimada en 2×10^{-3} por posición por generación viral, debido a que tiene una RNA polimerasa dependiente de RNA que no corrige los errores y por lo tanto genera los cambios o mutaciones; lo anterior genera variaciones genéticas de una misma cepa (5).

La **deriva génica observada en el virus de influenza**, son cambios específicos de nucleótidos individuales en los genes que codifican para diversas proteínas. En el caso del virus de la influenza, estos cambios son de mayor importancia en los sitios antigénicos de la HA y NA porque son los sitios en los cuales la respuesta inmunológica por anticuerpos participa en la neutralización del virus previo a la infección. También estos cambios pueden alterar la afinidad por el receptor celular y evadir la respuesta celular por linfocitos T citotóxicos (26, 29).

La **sustitución antigénica** ocurre cuando dos virus de influenza tipo A de diferentes subtipos infectan a una misma célula (coinfeción); permitiendo que el virus intercambie varios segmentos, generando un nuevo subtipo de virus o bien el mismo subtipo, pero con diferentes segmentos, este fenómeno también es conocido como rearreglo genético (29, 30). El rearreglo genético del virus puede permitirle adaptarse al huésped y en ocasiones causar brotes que pueden afectar a los humanos; ejemplo de ello fue la pandemia ocurrida en Tailandia, Vietnam y Camboya por el virus de influenza aviar de alta patogenicidad (IAAP) A/pollo/Viet Nam/2004(H5N1) (31, 32).

Mutaciones de patogenicidad y transmisión

El virus de la influenza tipo A ha tenido mutaciones progresivas, que favorecen la aparición de nuevas cepas virales las cuales pueden clasificarse en virulentas o no virulentas en función del sitio de corte proteolítico de la HA. El sitio puede ser cortado por endoproteasas presentes en el tracto respiratorio y digestivo como la tripsina, mientras que otras enzimas ubicuas como las furinas permiten la infección viral en otras células del

organismo incluido el tracto respiratorio y digestivo (33). Esta característica conferida por las mutaciones ayuda al proceso de hidrólisis y activación de la HA junto con la NA, que participa incrementando la concentración de proteasas al unirse al plasminogeno el cual es un precursor de la plasmina. Además de la HA y NA, existen otras proteínas virales que están asociadas a la patogenicidad del virus como la PB1, PB2 y PA, responsables de la replicación del genoma vírico. La proteína PB1-F2 codificada dentro del segmento dos es responsable de la citotoxicidad de los macrófagos ya que interactúa con las proteínas ANT3 y VDCA1 de la membrana interna mitocondrial implicadas en la permeabilidad de esta, lo que provoca el inicio del proceso de apoptosis, desencadenando una inmunosupresión por muerte de células inmunes, confiriéndole su alta capacidad patogénica (34).

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los ancestros de virus de la influenza tipo A que afectan al hombre y a los cerdos son aparentemente el virus de influenza tipo A presente en aves silvestres. Estudios filogenéticos sobre la nucleoproteína de virus aislados en aves, muestran la existencia de sublinajes separados entre Eurasia y América; esto demuestra que las aves migratorias que se desplazan de manera latitudinal entre continentes, tienen poca o ninguna participación en la transmisión de la influenza tipo A. Por el contrario, las aves que migran longitudinalmente parecen tener una participación en el proceso continuo de evolución del virus. El análisis de comparación múltiple entre secuencias de aminoácidos de diferentes virus aislados de aves, muestra que tienen una baja tasa evolutiva en comparación con los virus aislados en mamíferos (35).

En Europa, Asia, América del Norte y Australia han notificado frecuentemente diversos subtipos del virus de la influenza, que se encuentran en aves comerciales y silvestres. En Asia se han reportado brotes de IAAP del subtipo H5H1, entre otros subtipos de baja patogenicidad. En 1983 y 2004 se aislaron los subtipos H5N2 en Estados Unidos de América y en 2004 el subtipo H7N3 en Canadá (36, 37). América Latina y el Caribe están libres de IAAP H5N1, pero tienen la presencia de otros subtipos de IAAP. En México, Guatemala y El Salvador se ha reportado el subtipo H5N2 y el subtipo H7N3 en Chile (15, 38).

2.1 Situación de México

En México se detectó por primera vez el virus de la influenza aviar de baja patogenicidad (IABP) subtipo H5N2 en el año de 1994 en granjas avícolas del centro del país; en ese mismo año, meses más tarde se detectó el virus de alta patogenicidad (IAAP). La ecología del virus de la influenza con base en estudios de la filogenia viral es compleja, ya que el virus de la Influenza A tiene como hospedero primario a las aves acuáticas silvestres donde los subtipos H1-16 se han aislado de aves acuáticas en Eurasia y los subtipos H14, H15 y H16 no han sido detectados en América. (29).

En México el virus de la influenza aviar H5N2 de baja patogenicidad está presentando constantes variaciones genéticas que tienen una divergencia de antígenos importante en comparación con la cepa de la vacuna contra la IA. Se han realizado estudios filogenéticos con anterioridad, en donde los virus aislados dentro del periodo de 1994 a 1997 se dividieron en 2 grupos denominados Jalisco y Puebla, los cuales fueron cambiado

posteriormente, denominándolos A y B. Los del linaje A agrupan a todos los virus dentro de territorio nacional, mientras que los del grupo B se agrupan los virus de Puebla, Chiapas, Guatemala y El Salvador (2, 39)

3. JUSTIFICACIÓN Y DELIMITACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

3.1 Justificación práctica

En México, el virus de la influenza aviar H5N2 de baja patogenicidad está teniendo constantes variaciones genéticas y los aislamientos de virus de IA tienen una divergencia de antígenos importante en comparación con la cepa de la vacuna contra la IA (2, 40). La replicación de algunos virus de baja patogenicidad en pollos puede matar a los embriones de pollo mientras que otros no. La razón de por qué algunos virus considerados de baja patogenicidad matan embriones y otros no, es desconocida, pero se sabe que el sitio proteolítico de la HA con presencia de aminoácidos básicos está asociada a la alta patogenicidad. En el año 2009 se evaluaron varias cepas aisladas por el laboratorio de la Comisión México-Estados Unidos para la prevención de la fiebre aftosa y otras enfermedades de los animales (CPA) para la elaboración de vacunas. Durante ese estudio se observó que la cepa A/pollo/México/2007(H5N2) de baja patogenicidad tenía la característica de matar el 75% los embriones de pollo. El presente estudio caracterizó el genoma del virus A/pollo/México/2007(H5N2) que es letal en embrión de pollo.

4. HIPOTESIS

El virus de influenza de baja patogenicidad A/pollo/México/2007(H5N2) es un virus con genoma de origen de pollo en México con características de baja patogenicidad.

5. OBJETIVO DE LA INVESTIGACIÓN

5.1 Objetivo general

Determinar el origen genético del virus de influenza A/pollo/Mexico/2007(H5N2) a través de análisis filogenético.

5.2 Objetivos específicos

1. Secuenciación de nucleótidos y análisis *in silico* del genoma del virus de influenza A/pollo/Mexico/2007(H5N2).

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Amplificación de secuencias

Los ocho segmentos fueron amplificados para secuenciación con base en primers universales (41) y otros primers diseñados previamente en el laboratorio de Ecomedicina del Departamento de Medicina y Zootecnia de Aves.

Se determinó la secuencia genómica completa mediante el método de Sanger (42). Los 8 segmentos del genoma del virus codifican 11 proteínas (PB2, PB1, PA, PA-X, HA, NP, NA, M1, M2, NS1, y NS2) con longitudes de 759, 756, 716, 368, 566, 498, 454, 252, 97, 230 y 121 aminoácido respectivamente.

Alineamiento de secuencias

Se realizaron alineamientos pareados múltiples de las secuencias de nucleótidos de los ocho segmentos utilizando el programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) con aquellas secuencias de virus que fueron aislados de

pollo, que estuvieran dentro del periodo de 1993 a 2012 y que el aislado presente los ocho segmentos del virus registrados en el banco de genes del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI, por sus siglas en inglés).

6.2 Análisis filogenético

Se seleccionaron del banco de genes del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) las secuencias de los ocho segmentos disponibles de virus de Influenza Aviar subtipo H5N2 de baja y alta patogenicidad que correspondieron a aislamientos virales realizados a partir de pollos en México y Centro América, así como algunos de América del Norte y Euroasia. Se excluyeron del análisis aquellas secuencias que tuvieran espacios (gaps), secuencias parciales y aquellos virus que tuvieran incompleto el genoma.

Los alineamientos de las secuencias de nucleótidos obtenidas del banco de genes con las pertenecientes al virus bajo análisis, se realizó mediante el método de alineamiento progresivo de Clustal W. Posteriormente se calcularon las distancias genéticas entre las secuencias con el modelo de Kimura dos parámetros. Con los valores obtenidos, se construyeron los dendrogramas utilizando el algoritmo Neighbor-Joining por medio del programa MEGA versión 5.05. Las estimaciones de la significancia estadística de la filogenia se calcularon mediante el método de 1000 réplicas.

A partir del árbol filogenético se definieron grupos con base en los nodos observados a las regiones geográficas y años de aislamiento de los virus. Se calcularon las distancias genéticas entre grupos y dentro de los grupos utilizando el programa MEGA versión 5.05.

6.3 Traducción de secuencias

Se tradujo la secuencia de nucleótidos a aminoácidos por medio del programa ExPASy (43), que pertenece al Instituto Suizo de Bioinformática. Para la identificación del sitio de corte dado por una Arginina o Lisina, que es la región blanco de proteólisis, se empleó el Servidor de Predicción ProP 1.0 (44, 45) del Centro para el Análisis de Secuencias Biológicas (CBS) de la Universidad Técnica de Dinamarca.

La identificación de posibles sitios de glicosilación en la asparagina (N) de la HA cuando ocurre N-X-[T/S], en donde X puede ser cualquier aminoácido excepto Prolina (P) (46), se realizó a través del servidor NetNGlyc 1.0 (47) del CBS.

Para identificar eliminaciones de al menos 10 aminoácidos en la región tallo de la Neuraminidasa, la cual comienza en el residuo 36 y termina con una Cisteína (Cys= C) altamente conservada en la posición 92 (48), se alineó y comparó la secuencia de aminoácidos de la NA del virus estudiado con la del virus de alta patogenicidad A/pollo/Queretaro/14588-19(H5N2), con número de acceso ABI85130 en el banco de genes del NCBI; este virus es considerado altamente virulento para las aves comerciales y se demostró en un estudio previo que presenta una eliminación de 20 aminoácidos en dicha región de la NA (49).

En ambas secuencias de aminoácidos se evaluó la presencia de mutaciones asociadas con la adición de sitios de glicosilación, cambios en el sitio de unión a receptores que modifiquen el reconocimiento de los mismos a diferentes hospedadores, así como la

presencia de mutaciones previamente reportadas que confieran resistencia a fármacos antivirales.

7. RESULTADOS

7.1 Similitud entre secuencias

Al observar el análisis múltiple de apareamientos de cada segmento del virus A/pollo/México/2007(H5N2) con el programa BLAST, se muestra que las secuencias de nucleótidos de los segmentos 1 (PB1), 2 (PB2), 3 (PA), 4 (HA), 6 (NA) y 8 (NEP) tienen un porcentaje de similitud del 95% con aislados encontrados en Guatemala, mientras que el segmento 5 (NP) y 7 (M) con Hidalgo y El Salvador respectivamente (Cuadro 2). El análisis múltiple con los genes del virus A/pollo/México/2007(H5N2) muestra que la similitud del gen PB2, PB1, HA, NA y NP es del 94% con aislados de Guatemala; mientras que el gen PA, NP y M tienen una similitud del 94% con virus aislados de Ibaraki, Hidalgo y El Salvador respectivamente; cubriendo un alto porcentaje de la secuencia (cobertura) (Cuadro 3).

Cuadro 2. Porcentaje de mayor similitud de nucleótidos de cada uno de los 8 segmentos del virus A/pollo/México/2007(H5N2) con secuencias obtenidas de genomas completos.

Segmento	Aislado	% Identidad	% Cobertura
1	A/pollo/Guatemala/45511-1/2000 (H5N2)	95	98
2	A/pollo/Guatemala/45511-1/2000 (H5N2)	95	99
3	A/pollo/Guatemala/45511-1/2000 (H5N2)	95	99
4	A/pollo/Guatemala/45511-1/2000 (H5N2)	96	97
5	A/pollo/Hidalgo/28159-232/1994 (H5N2)	94	100
6	A/pollo/Guatemala/45511-1/2000(H5N2)	94	100
7	A/pollo/El Salvador/102711-1/01 (H5N2)	96	100
8	A/pollo/Guatemala/45511-5/2000 (H5N2)	96	98

Cuadro 3. Porcentaje de mayor identidad de nucleótidos de cada uno de los 8 genes del virus A/pollo/México/2007(H5N2) con secuencias de genes completos.

Genes	Aislado	% Identidad	% Cobertura
1	A/pollo/Guatemala/45511-1/2000(H5N2)	95	99
2	A/pollo/Guatemala/45511-1/2000(H5N2)	95	99
3	A/pollo/Ibaraki/1/2005(H5N2)	96	100
4	A/pollo/Guatemala/45511-5/2000(H5N2)	96	99
5	A/pollo/Hidalgo/28159-232/1994(H5N2)	94	100
6	A/pollo/Guatemala/45511-1/2000(H5N2)	94	100
7	A/pollo/El Salvador/102711-1/01(H5N2)	96	99
8	A/pollo/Guatemala/45511-1/2000(H5N2)	95	100

El análisis de identidad en secuencia de aminoácidos de cada una de las 8 proteínas del virus A/pollo/México/2007 (H5N2) mostró que las proteínas PB2, PB1, M y NEP tiene mayor similitud con virus aislados en Guatemala, las proteínas de la PA y HA con virus aislado en Japón en la región de Ibaraki; y las proteínas NP y NA con virus aislados en Jalisco (Cuadro 4).

Cuadro 4. Porcentaje de identidad de aminoácidos de cada uno de los 8 genes del virus A/pollo/México/2007(H5N2) con secuencias de genoma completo de virus.

Segmento	Aislado	% Identidad	% Cobertura
1	A/pollo/Guatemala/45511-5/2000(H5N2)	98	100
2	A/pollo/Guatemala/45511-1/2000(H5N2)	98	100
3	A/pollo/Ibaraki/1/2005(H5N2)	98	100
4	A/pollo/Ibaraki/1/2005(H5N2)	95	100
5	A/pollo/Jalisco/14589-660/1994(H5N2)	98	100
6	A/pollo/Jalisco/14589-660/1994(H5N2)	94	100
7	A/pollo/Guatemala/45511-1/2000(H5N2)	98	100
8	A/pollo/Guatemala/45511-1/2000(H5N2)	96	100

7.2 Distancia genética entre poblaciones:

Se realizó el análisis de distancias genéticas entre los 17 aislados para entender la evolución y el origen de los 8 segmentos del virus A/pollo/México/2007(H5N2).

Comenzando con:

Segmento 1 (PB2): El A/pollo/México/2007(H5N2) tiene una menor distancia genética (0.057) con los aislados de Guatemala A/pollo/Guatemala/45511-1/2000 y A/pollo/Guatemala/194573/2002(H5N2), y una mayor distancia genética (0.191) con el aislado asiático A/pollo/Hebei/1102/2010(H5N2). Dentro de los aislados de México, el que mantiene una menor distancia genética (0.068) con el aislado de interés es el aislado A/pollo/Jalisco/14589-660/1994(H5N2), mientras que el aislado que se mantiene más alejado genéticamente (0.082) es el A/pollo/México/22184/1998(H5N2).

Segmento 2 (PB1, PB1-F2): El segmento 2 del A/pollo/México/2007(H5N2) tiene una menor distancia genética (0.057) con los aislados de Guatemala A/pollo/Guatemala/45511-1/2000(H5N2) y A/pollo/Guatemala/194573/2002(H5N2), y una mayor distancia genética (0.191) con el aislado asiático A/pollo/Hebei/1102/2010(H5N2). Dentro de los aislados de México, el que mantiene una menor distancia genética (0.068) con el aislado de interés es el aislado A/pollo/Jalisco/14589-660/1994 mientras que el aislado que se mantiene más alejado genéticamente (0.082) es A/pollo/México/22184/1998 (H5N2).

Segmento 3 (PA, PA-X): El segmento 3 del A/pollo/México/2007(H5N2) tiene un menor distancia genética con los aislados de Guatemala A/pollo/Guatemala/45511-1/2000(H5N2) y A/pollo/Guatemala/194573/2002(H5N2) y una mayor distancia genética (0.145) con el aislado asiático A/pollo/Taiwan/A1997/2012(H5N2), con excepción del aislado asiático A/pollo/Ibaraki/1/2005(H5N2), que mantiene una distancia corta (0.043). Respecto a los aislados de México, la menor distancia genética con el aislado de este

estudio es el A/pollo/Hidalgo/28159-232/1995(H5N2) y el que tiene una mayor distancia genética es el A/pollo/México/22184/1998(H5N2).

Segmento 4 (HA): El segmento 4 del A/pollo/México/2007(H5N2) tiene una distancia genética menor (0.042) con los aislados de Guatemala A/pollo/Guatemala/45511-1/2000(H5N2) y A/pollo/Guatemala/45511-5/2000(H5N2); y una mayor distancia genética con el aislado A/Pollo/Hebei/2010(H5N2) (0.365). En los aislados de México, se observa que el aislado A/pollo/Hidalgo/28159-232/1994(H5N2) es el que mantiene una menor distancia genética es (0.096) y el aislado de México que mantiene una mayor distancia genética (0.123) es el aislado A/pollo/México/22184/1998(H5N2).

Segmento 5 (NP): El segmento 5 del A/Pollo/México/2007(H5N2) tiene una menor distancia genética (0.049) con el A/pollo/Guatemala/1998(H5N2) y una mayor distancia genética (0.365) con el aislado A/Pollo/Hebei/2010(H5N2); mientras que la distancia genética (0.066) con el A/pollo/Hidalgo/28159-232/1994(H5N2). Así mismo, en la matriz de distancias genéticas, se pudo observar que los aislados están definidos por las regiones geográficas. Los aislados Asiáticos, Europeos y Americanos guardan una distancia genética marcada entre sí, también se pueden observar la diferencia de distancia entre regiones del continente americano y dentro de México, dividiendo al país en regiones, en la primera de ellas se encuentran los aislados de estados, que se localizan en el centro del país y otros estados del sur que guardan una distancia genética menor con países de Centroamérica, dentro de estos aislados encontramos al A/pollo/México/2007(H5N2).

Segmento 6 (NA): El segmento 6 del A/Pollo/México/2007(H5N2), el cual tiene una menor distancia genética con los aislados de los países de centro América, en particular con el A/Pollo/Guatemala/45511-1/2000(H5N2) (0.062), pero una mayor distancia genética (0.253) con el aislado A/pollo/Hebei/2010(H5N2). Dentro de los aislados mexicanos el que menor distancia mantiene con el aislado de interés es el aislado A/pollo/Hidalgo/28159-232/1994 (0.088). Así mismo, se pudo observar que los aislados americanos, mantienen una distancia corta entre ellos.

Segmento 7 (M1 y M2): El segmento 7 del A/pollo/México/2007(H5N2) tiene una menor distancia genética (0.042) con los aislados A/pollo/Guatemala/45511-1/2000(H5N2) y A/pollo/El Salvador/102711-2/2001(H5N2), pero una mayor distancia genética (0.158) con el aislado A/pollo/Hebei/2010(H5N2). Así mismo, en la matriz de distancias genéticas por el modelo de Kimura, se pudo observar que los aislados de América del Norte, mantienen una distancia corta entre ellos.

Segmento 8 (NS1 y NS2): El segmento 8 del A/pollo/México/2007(H5N2) tiene una menor distancia genética (0.048) con los aislados A/pollo/Guatemala/45511-1/2002(H5N2) y A/pollo/Guatemala/194573/2002(H5N2), así como con el aislado de El Salvador e Ibaraki; pero una mayor distancia genética con los aislados asiáticos, siendo el aislado A/pollo/Hebei/1102/2010(H5N2) el más alejado de estos (0.586), con excepción del aislado A/pollo/Ibaraki/1/2005(H5N2) asiático que conserva una distancia genética de 0.054; dentro de los aislados de México el que mantiene menos distancia genética (0.065) fue el aislado A/pollo/Hidalgo/28159-232/1994(H5N2). Adicionalmente, los datos de

identidad genética obtenidos con estos marcadores moleculares indican que los aislados de las regiones Europeas y asiáticas mantienen una distancia genética estrecha de 0.000-0.376 que es similar a los observados entre los aislados en México y Centroamérica.

7.3 Dendogramas:

Para evidenciar lo descrito en la tabla de distancia entre comparación de pares y la historia evolutiva de los segmentos aislados de los virus con más detalle, se construyeron dendogramas en base a la secuencia de nucleótidos.

Segmento 1: En la figura 1 podemos observar que se divide el dendograma en tres grupos principalmente, en uno de ellos se observan los aislados correspondientes de la Republica Mexicana (azul marino), un grupo morado con algunos aislados de Estados Unidos y un grupo anaranjado con los aislados correspondientes a países centroamericanos y dentro de este mismo grupo encontramos un aislado japonés. Es de resaltar, que el aislado de interés (A/pollo/México/2007(H5N2)) no se agrupo en estos grupos; sin embargo, se observa que mantiene un ancestro común con el grupo de los aislados centroamericanos.

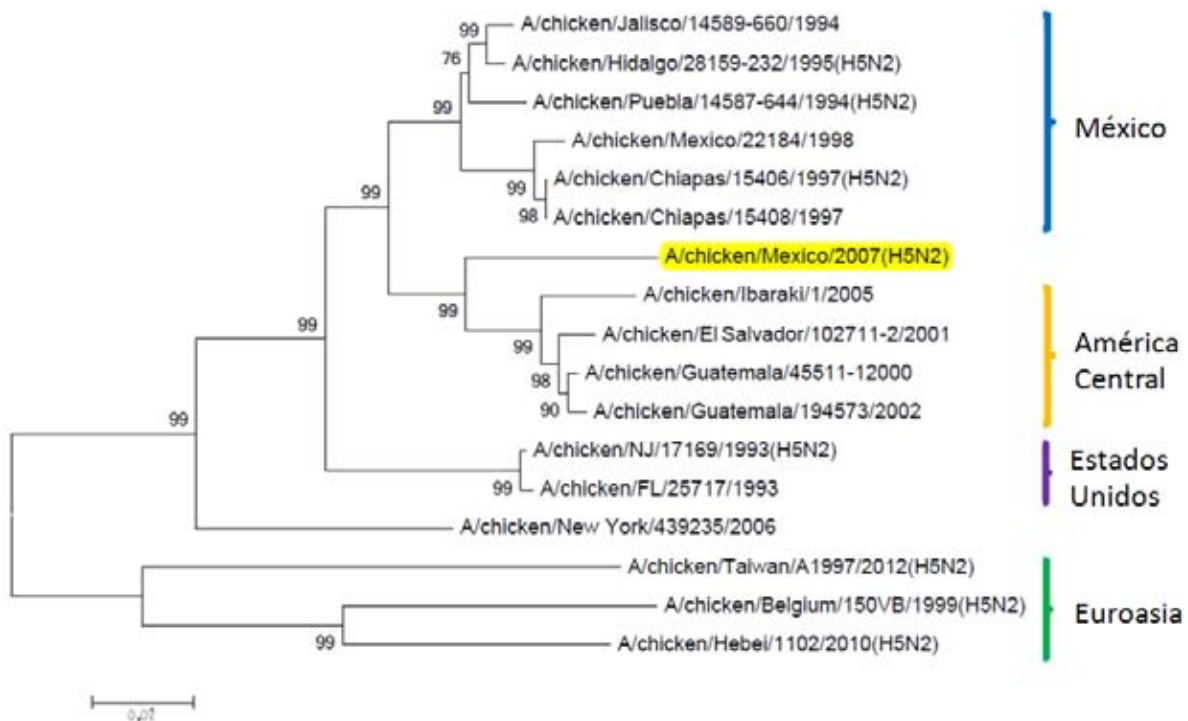


FIGURA. 1 Dendrograma de la relación filogenética en base a la secuencia de nucleótidos del segmento 1, que codifica para la proteína no estructural PB2 del virus de influenza A/pollo/México/2007(H5N2) con 17 aislados representativos de varios países del mundo durante 1993-2012.

Segmento 2: En la figura 2 podemos observar que se divide en tres grupos principalmente, en uno de ellos se observan aislados correspondientes de la Republica Mexicana (azul marino), un grupo morado con algunos aislados de Estados Unidos y un grupo (anaranjado) con los aislados correspondientes a países centroamericanos y dentro de este mismo grupo, encontramos un aislado Japonés; el aislado de interés (A/pollo/México/2007 (H5N2)) no se encuentra dentro de estos grupos; sin embargo, se observa que mantiene un ancestro común con el grupo de los aislados pertenecientes a países centroamericanos.

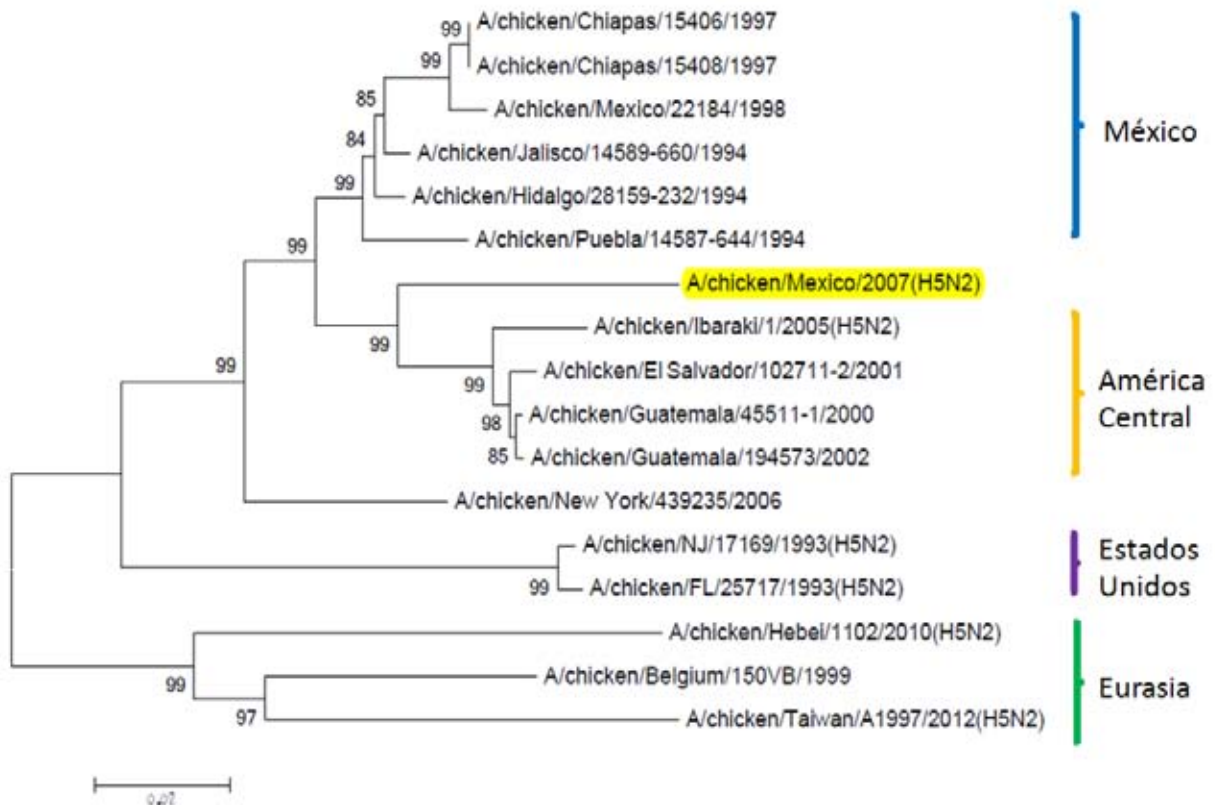


FIGURA. 2 Dendograma de la relación filogenética en base a la secuencia de nucleótidos donde del segmento 2, que codifica para la proteína no estructural PB1 del virus de influenza A/pollo/México/2007(H5N2) con 17 aislados representativos de varios países del mundo durante 1993-2012.

Segmento 3 (PA, PA-X): En la figura 3, podemos observar que se divide en dos grupos principalmente, en uno de ellos se observan cepas correspondientes de la Republica Mexicana (azul marino) y un grupo (anaranjado) con los aislados correspondientes a países centroamericanos, dentro de este mismo grupo encontramos el aislado de interés (A/pollo/México/2007(H5N2)) además de un aislado Japonés A/pollo/Ibaraki/1/2005(H5N2).

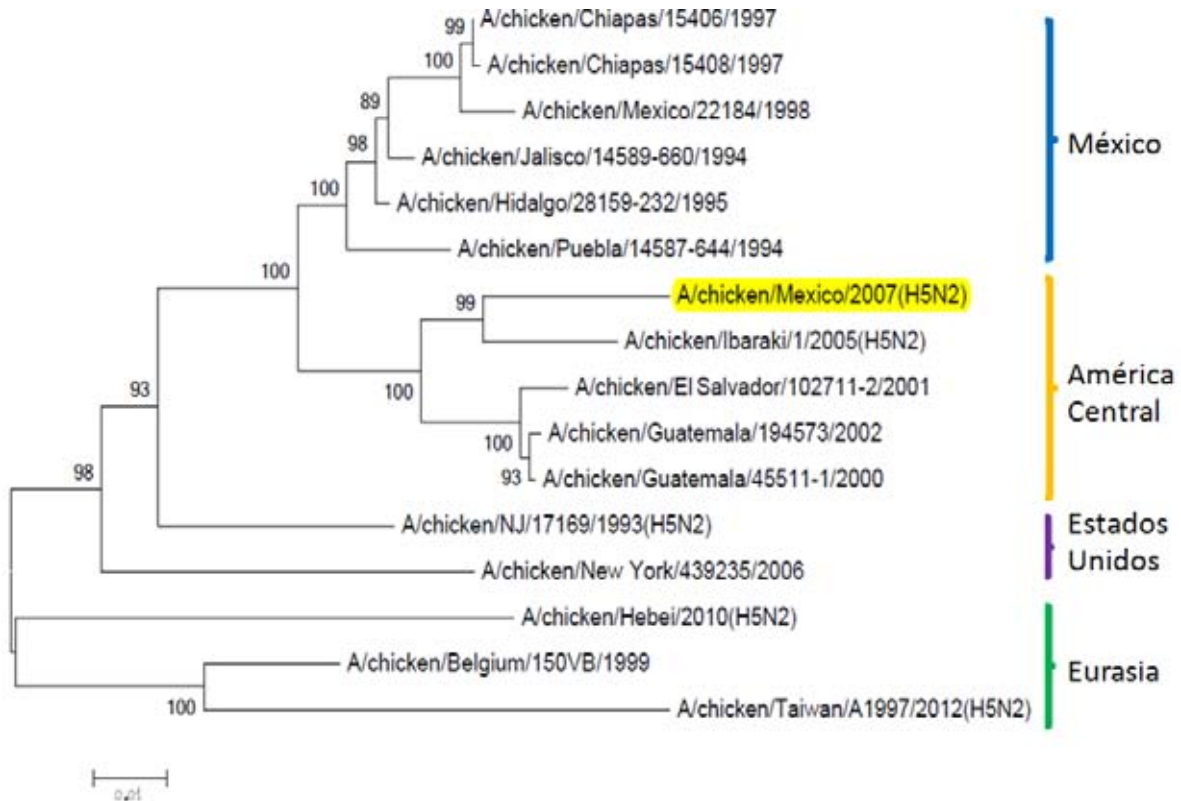


FIGURA. 3 Dendrograma de la relación filogenética en base a la secuencia de nucleótidos del segmento 3, que codifica para las proteínas polimerasa ácida (PA) y polimerasa ácida X (PA-X) del virus de influenza A/pollo/México/2007(H5N2) con 16 aislados representativos de varios países del mundo durante 1993-2012.

Segmento 4 (HA): En la figura 4, podemos observar que se divide en tres grupos, en uno de ellos se observan cepas correspondientes de la República Mexicana (azul marino), un grupo morado con algunos aislados de Estados Unidos y un grupo (anaranjado) con los aislados correspondientes a países centroamericanos, dentro de este mismo grupo encontramos el aislado de interés (A/pollo/México/2007(H5N2)), además de un aislado Japonés A/pollo/Ibaraki/1/2005(H5N2).

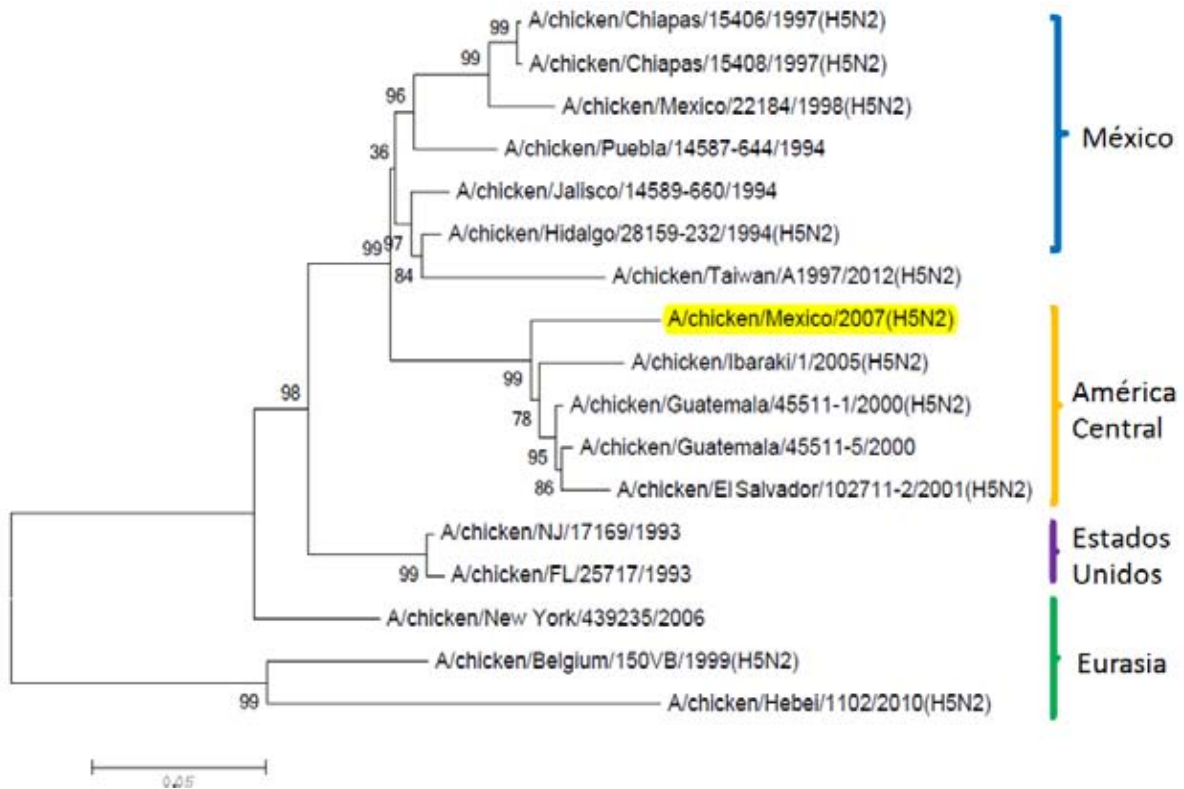


FIGURA. 4 Dendograma de la relación filogenética en base a la secuencia de nucleótidos del segmento 4, que codifica para la proteína hemaglutinina (HA) del virus de influenza A/pollo/México/2007(H5N2) con 17 aislados representativos de varios países del mundo durante 1993-2012.

Segmento 5 (NP): Se puede observar que se divide en dos grupos en América, en uno de ellos se observan aislados correspondientes de la Republica Mexicana, Guatemala y El Salvador además de un aislado Japonés A/pollo/Ibaraki/1/2005(H5N2) (azul marino), un grupo morado con algunos aislados de Estados Unidos. El aislado de interés (A/pollo/México/2007(H5N2)) no se encuentra dentro de estos grupos; sin embargo, se observa que mantiene un ancestro común con el grupo de los aislados pertenecientes a países centroamericanos y México.

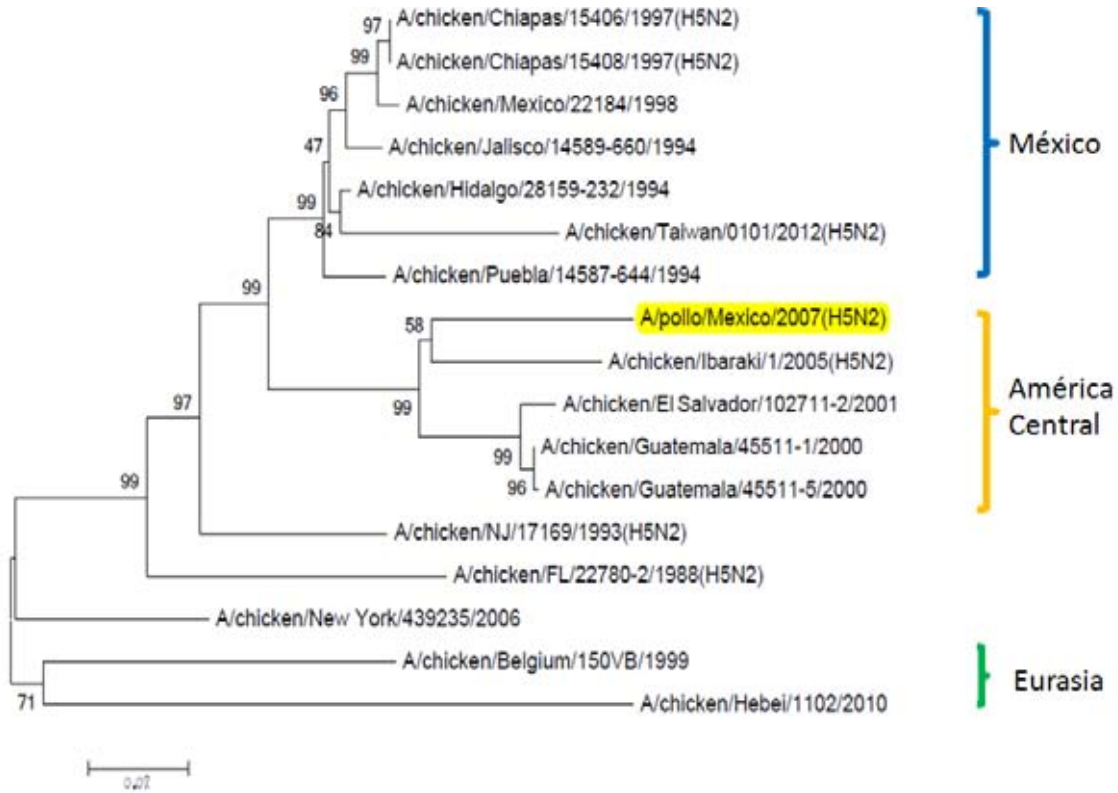


FIGURA. 5 Dendrograma de la relación filogenética en base a la secuencia de nucleótidos del segmento 5, que codifica para la nucleoproteína (NP), del virus de influenza A/pollo/México/2007(H5N2) con 17 aislados representativos de varios países del mundo durante 1993-2012.

Segmento 6: Se puede observar dos grupos en América, en el primero de ellos se observa cepas correspondientes a aislados dentro de diversos estados de la región central y sur de México (azul); en otro grupo encontramos al aislado de interés A/pollo/México/2007(H5N2) junto con aislados ubicados en países centroamericanos (anaranjado).

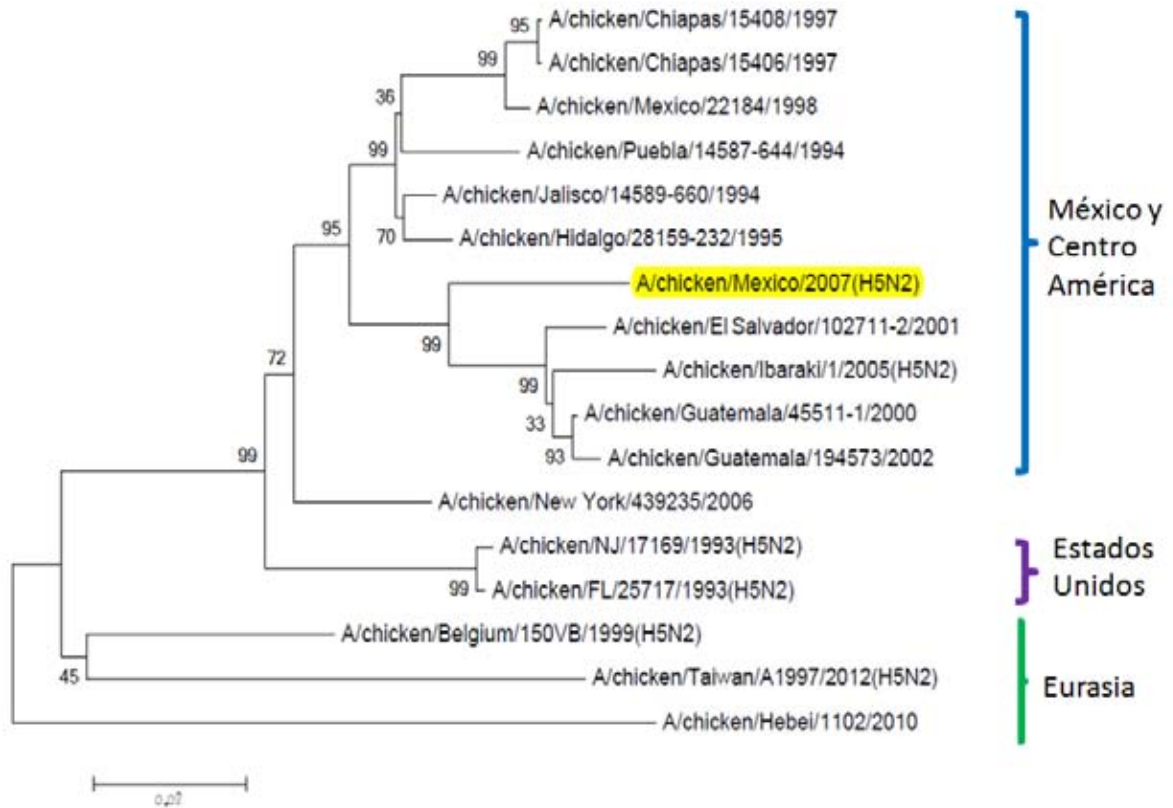


FIGURA 6. Dendrograma de la relación filogenética en base a la secuencia de nucleótidos del segmento 6, que codifica para la proteína neurominidasa NA, del virus de influenza A/polo7México/2007(H5N2) con 17 aislados representativos de varios países del mundo durante 1993-2012.

Segmento 7: Se puede observar que se divide en 2 grupos, en el primero de ellos se observan aislados correspondientes a países de centroamérica y de la República Mexicana guardando una estrecha distancia genética (azul); en el otro grupo (morado), encontramos aislados correspondientes a aislados de Estados Unidos de América.

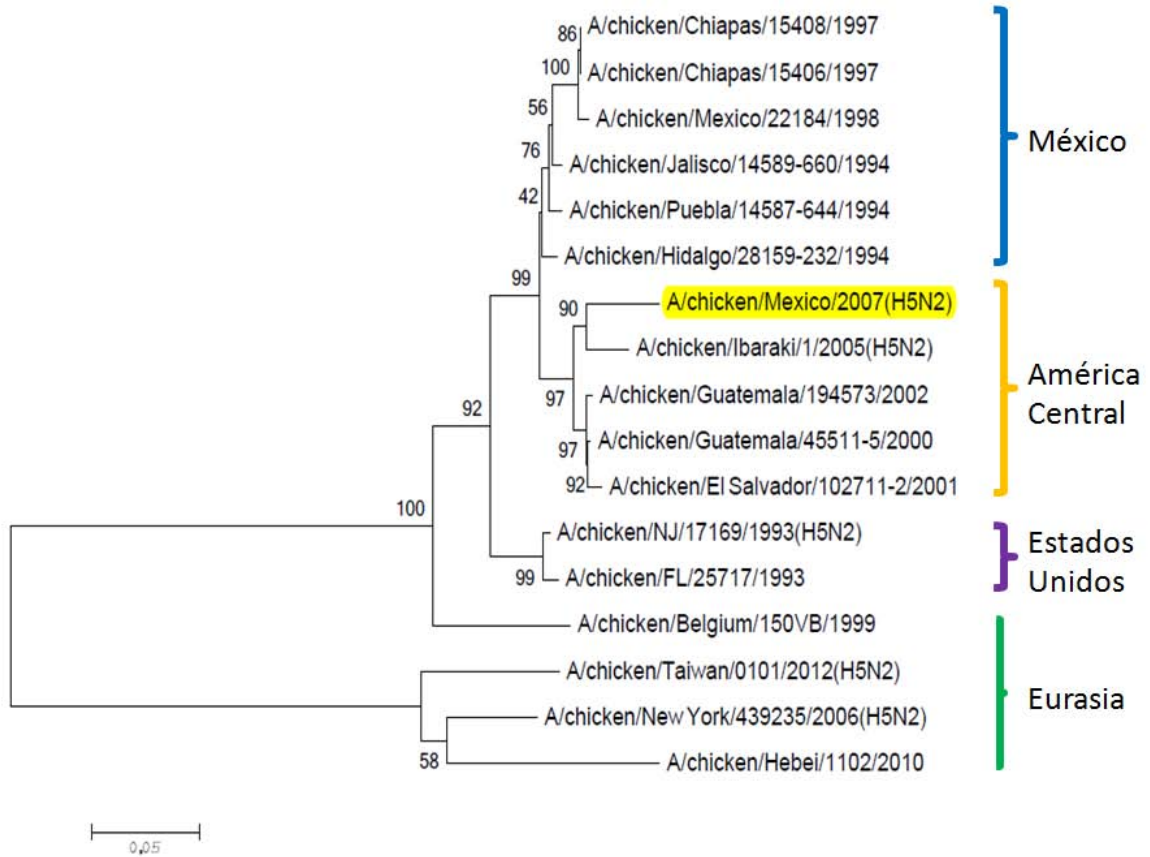


FIGURA. 7 Dendograma de la relación filogenética en base a la secuencia de nucleótidos del segmento 7, que codifica para las proteínas no estructurales NS1 y NS2, del virus de influenza A/pollo/México/2007(H5N2) con 17 aislados representativos de varios países del mundo durante 1993-2012.

Segmento 8: En la figura 8 se pueden observar tres grupos principalmente, en uno de ellos se agrupan secuencias correspondientes a los aislados mexicanos (azul), en otro grupo se encuentran secuencias centroamericanas con una cercanía filogenética (anaranjado), que incluyen al aislado A/pollo/México/2007(H5N2) y a A/pollo/Ibaraki/1/2005(H5N2) de origen asiático; además en otro grupo se encuentran los aislados americanos (morado).



FIGURA. 8 Dendrograma de la relación filogenética en base a la secuencia de nucleótidos del segmento 8, que codifica para las proteínas de matriz M1 y M2, del virus de influenza A/pollo/México/2007(H5N2) con 17 aislados representativos de varios países del mundo durante 1993-2012.

7.4 Genoma y proteínas:

Se realizó un análisis de las características moleculares *in silico* de este virus a partir de la secuencia del genoma de los ocho segmentos que correspondieron a 13,492 nucleótidos, que traducen once proteínas: PB2, PB1, PA-X, HA, NP, NA, M y NS, pero carece de la proteína PB1-F2 (Cuadro 5).

Cuadro 5. Longitud de aminoácidos de las diez proteínas del virus A/pollo/México/2007 (H5N2).

Segmento	Nucleótidos	Aminoácidos
1 (PB2)	2,341	759
2 (PB1)	2,307	756
3 (PA-X)	2,233	716 y 378
4 (HA)	1,778	566
5 (NP)	1,523	498
6 (NA)	1,393	454
7 (M1 y M2)	1,027	210 y 93
8 (NS1 y NS2)	890	230 y 100

7.5 Sitios de glicosilación

Se identificaron 5 sitios probables de N-glicosilación en la proteína de la hemoaglutinina localizados en la asparagina: 27, 39, 179, 302 y 555.

7.6 Especificidad de especie

Se encontraron que los aminoácidos del virus A/pollo/México/2007(H5N2) tiene los aminoácidos Gln en la posición 226 y Glu en 228 de la hemoaglutinina (HA) que se unen al ácido siálico α -2,3 de las células epiteliales del tracto respiratorio de las aves.

7.7 Resistencia a los antivirales

Se han asociado mutaciones en la NA que confieren resistencia a fármacos antivirales como el Osaltamivir y el Zanamivir, por lo tanto se analizó la secuencia de aminoácidos de la NA del virus A/pollo/México/2007(H5N2). Se observó la ausencia de estas mutaciones en el virus de estudio y en el A/pollo/Querétaro/14588-19/1994(H5N2) de alta patogenicidad como referencia (Cuadro 6).

Cuadro 6. Mutaciones presentes en la NA que confiere resistencia hacia el osaltamivir (O) y zanamivir (Z) del virus de influenza tipo A.

Posición	Mutación (Fármaco)	A/pollo/México/2007 (H5N2)	A/pollo/Querétaro/14588-19/1994(H5N2)
119	V/I (O,Z)	E	E
136	K (Z)	Q	Q
151	V/D (Z)	D	D
292	K (O,Z)	R	R
294	S (O)	N	N

La proteína M2 confiere resistencia a la amantadina a través de la combinación de las mutaciones en las posiciones L26F (Leu a Phe), V27A (Val a Ala) y S31N (Ser a Asn). En el aislado de interés se observó en la posición 26 la presencia de una leucina (Leu), en la posición 27 un ácido aspártico (Asp) y en la posición 31 presenta una Serina (Ser) por lo que el virus podría ser sensible a la amantadina (50).

7.8 Factores de virulencia

Son varios los factores que aumenta la virulencia y que se han reportado asociados a la expresión de los genes que codifican para las distintas proteínas del virus de influenza aviar, uno de ellos se encuentra en la proteína PA del virus H5N1, en el cual la combinación de aminoácido 224, el cambio de una serina (Ser), por una prolina (Pro), y la presencia de un ácido aspártico (Asp) en el aminoácido en la posición 383; aumenta la replicación del virus en fibroblastos en embrión de pato. (17). En el aislado A/pollo/México/2007(H5N2) se observa una serina (Ser) en la posición 224 y un ácido aspártico (Asp) en la posición 383.

Otro factor de virulencia es la secuencia de aminoácidos que presenta el virus en el sitio de corte de la HA en la posición 342 de la proteína, la patogenicidad se encuentra asociada con la presencia de múltiples aminoácidos básicos (Arg o Lys). La secuencia de aminoácidos que presenta la HA del virus en el sitio de corte del aislado A/pollo/México/2007(H5N2) es característico de cepas del virus de influenza aviar de baja patogenicidad (Cuadro 7) (51).

Cuadro 7. Secuencia de sitio de corte de diferentes aislados donde se observan los aminoácidos básicos presentes en dichas secuencias.

AISLADOS	SITIO DE CORTE
A/pollo/México/2007 (H5N2)	V-P-Q-R-E-X-R G-L
A/pollo/Ibaraki/1/2005 (H5N2)	V-P-Q-R-E-T-R G-L
A/pollo/Querétaro/19/95 (H5N2) IAAP	Q-R-K-R-K-T-R G-L

La NA del virus del presente estudio tiene la eliminación de 20 aminoácidos en la región hidrofóbica dejando una proteína de 449 aminoácidos, al igual que todos los aislados de México utilizados para este trabajo, incluyendo el aislado de influenza aviar H5N2 de alta patogenicidad A/pollo/Querétaro/14588-19/1994(H5N2) (52, 53).

8. Discusión

El análisis del genoma y proteínas del virus A/chicken/México/2007 (H5N2) muestra que todos los segmentos tienen mayor porcentaje de similitud con virus H5N2 de pollo y con mayor relación con virus aislados de Guatemala, El Salvador, México y con un aislado japonés A/pollo/Ibaraki/1/2005(H5N2) de años recientes (54).

La falta de secuencia de nucleótidos completas para todo el genoma de virus de influenza aviar aislados de origen mexicano y de otros países dificulta precisar el origen genético para el virus analizado en este estudio. Sin embargo, la comercialización dentro de las seis

regiones para el control de la enfermedad en México permitiría la circulación y difusión del virus con pocos cambios genéticos: Norte, Occidente, Centro Sur, Istmo, Sur, y Peninsular (55) podría explicar las relaciones genéticas observadas en este trabajo (56).

El tamaño del genoma del virus A/pollo/México/2007(H5N2) fue de 13,492 nucleótidos y la longitud de cada segmento del virus coincide con los reportados en la literatura para virus de influenza aviar (57).

La longitud de las proteínas en la mayoría de los casos es idéntica a las longitudes, que se encuentran registradas en la base de datos del GenBank.

En este estudio se observa que las diferencias en la longitud de secuencias de aminoácidos de las proteínas M1 y NS2 podrían ser por adición o eliminación de nucleótidos, ya sea por la técnica o por la naturaleza del virus.

Con base en la traducción de proteínas por el genoma, se predice que el virus de estudio codifica para once de las doce proteínas. La falta de la PB1-F2 que induce apoptosis en macrófagos, podría ser un factor menos dentro de la virulencia del virus de estudio. Sin embargo, tiene la proteína PA-X que podría inhibir la expresión de ARN polimerasa II e interfiere en la respuesta inmunológica de la célula (12).

La HA del A/pollo/México/2007(H5N2) tiene una longitud de 1,778 nucleótidos, que codifica para una proteína de 564 aminoácidos que corresponde a lo reportado (58). Se realizó una comparación con una cepa de alta patogenicidad A/pollo/Querétaro/19/95(H5N2) y con otra cepa de baja patogenicidad. En la

comparación se observa que el aislado A/pollo/Ibaraki/3/2005(H5N2) reportado como de baja patogenicidad presenta en el sitio de corte dos aminoácidos básicos, de la misma forma que el aislado de interés; mientras que el aislado reportado como de alta patogenicidad, presenta seis aminoácidos básicos en el sitio de corte, característica de una hemaglutinina (HA) de alta patogenicidad (51).

La eliminación de 20 aminoácidos (aa) de la neuroaminidasa (NA) dentro del aislado de interés, así como los demás aislados utilizados para este trabajo fue como se esperaba, ya que como se refiere en otros artículos (44) esta eliminación solo se presenta en virus adaptados en los pollos y otras aves de corral, no así en aves silvestres.

Los 7 sitios de glicosilación (27, 39, 142, 179, 302, 496 y 555) que son importantes para la evasión del sistema inmune y la interacción de reconocimiento de la hemaglutinina con las estructuras del ácido siálico α -2,3 presente en la superficie de las células, corresponde a lo publicado en los estudios de Jiao P. et al (60).

Al realizar la traducción de nucleótidos y analizar las secuencias de aminoácidos de la proteína de cada uno de los ocho segmentos, se observó que ninguno de los aislados en este estudio haya adquirido mutaciones genéticas en las posiciones de aminoácidos asociados a la unión al receptor ácido siálico α -2,3, aumento de virulencia, aumento en la patogenicidad, o resistencia a fármacos. Existe un reporte de virus de influenza aviar con características moleculares de baja patogenicidad, pero que biológicamente se comportan de alta patogenicidad (61).

La razón por la cual el aislado A/pollo/México/2007(H5N2) es de baja patogenicidad en pollos, pero que mata embriones de pollo, no puede ser explicada en este estudio por lo que se requieren estudios moleculares y biológicos para identificar probables nuevas mutaciones de este virus en particular.

8. Conclusiones

- Se acepta la hipótesis, ya que el análisis filogenético de los ocho segmentos del virus A/pollo/México/2007 (H5N2) demostró que están relacionados con virus presentes en estados del sur del país, así como con los virus aislados en Guatemala y El Salvador, y estos mismos segmentos están distanciados de los aislados, asiáticos, europeos y de los aislados de Estados Unidos.
- El virus A/pollo/México/2007(H5N2) es un virus no recombinado porque no tiene segmentos que correspondan a otros subtipos.
- El virus de estudio A/pollo/México/2007H5N2) es un virus de influenza de baja patogenicidad, ya que la secuencia del sitio de corte de la hemoaglutinina presenta solo dos aminoácidos básicos. La polimerasa básica PA no tienen la combinación de las mutaciones necesarias para el fenotipo de alta patogenicidad. La neuraminidasa no presenta ninguna mutación para resistencia a fármacos como el oseltamivir y el zanamivir; y carece de 20 aminoácidos de la región “tallo” en la neuraminidasa.

REFERENCIAS:

1. Tong S, Zhu X, Li Y, Shi M, et al. New world bats harbor diverse influenza A viruses. *PLoS pathog.* USA, 2013; 9(10).
2. García-García J, Ramos C. La influenza un problema urgente de la salud pública. *Salud Pública Mex. Mex.*, 2006; 48:244-267.
3. Knipe DM, Howley PM. *Fundamental Virology* 4th ed. Raven Press, USA, 2001.
4. Jagger BW, Wise HM, Kash JC, et al. An Overlapping protein-coding region in influenza A virus segment 3 modulates the host response. *Science*, UK, 2012; 337: 199-204.
5. Hale GH, Randall RE, Ortín J, Jackson D. The multifunctional NS1 protein of influenza A viruses. *J. General Virol.*, UK, 2008; 89:2359-2376.
6. Noton SL, Medcalf E, Fisher D, Mullin AE, Elton D, Digard P. Identification of the domains of influenza A M1 matrix protein required for NP binding, oligomerization and incorporation into virions. *J. General Virol*, UK, 2007; 88: 2280-2290.
7. Blaas D, Patzelt E, Kuechler E. Identification of the cap binding protein of influenza virus. *Nucleic Acid Res*, Austria, 1982; 10(15): 4805-4812.
8. Nagata K, Kawagushi A and Naito T. Host factors for replication and transcription of the influenza genome. *Rev. Med. Virol. Japan*, 2008; 18: 247–260.
9. González S, Ortín J. Characterization of influenza virus PB1 protein binding to viral RNA: two separate regions of the protein contribute to the interaction domain. *J. Virol.* Spain, 1999; 73 (1): 631-637.

10. Gibbs JS, Malide D, Hornung F, et al. The influenza A virus PB1-F2 protein targets the inner mitochondrial membrane via a predicted basic amphipathic helix that disrupts mitochondrial function. *J. Virol.* Germany, 2003; 77: 7214-7224.
11. Zamarin D, Ortigoza MB, Palese P. Influenza A virus PB1-F2 protein contributes to viral pathogenesis in mice. *J. Virol.* USA, 2006; 80 (16):7976.
12. Song J, Feng H, Xu J, Zhao D, et al. The PA Protein Directly Contributes to the virulence of H5N1 avian influenza viruses in domestic ducks. *J. Virol.* Japan, 2011; 85; 2180-2188.
13. Fodor E, Crow M, Mingay LJ, et al. A single aminoacid mutation in the PA subunit of the influenza virus RNA polymerase inhibits endonucleolytic cleavage of capped RNAs. *J. Virol.* UK, 2002; 8989–9001.
14. Hara K, Schmidt SI, Crow M, and Brownlee GG. Amino Acid Residues in the N-Terminal Region of the PA Subunit of Influenza A Virus RNA Polymerase Play a Critical Role in Protein Stability, Endonuclease Activity, Cap Binding, and Virion RNA Promoter Binding. *J. Virol.* UK, 2006; 7789–7798.
15. Berhan Y, Hisanaga T, Kehler H, Neufeld J, Manning L, et al. Highly pathogenic avian influenza virus (H7N3) in domestic poultry, Saskatchewan, Canada, 2007. *Emerg. Infect. Dis.* Canada, 2009; 15(9): 1492-1495.
16. Kobasa D, Rodgers ME, Wells K, Kawaoka Y. Neuroaminidase hemadsorption activity, conserved in avian influenza A viruses does not influence viral replication in ducks. *J. Virol.* USA, 1997; 71: 6706-6713.

17. Matrosovich M, Zhou N, Kawaoka Y, Webster R. The surface glycoproteins of H5 Influenza Viruses isolated from humans, chickens and wild aquatic birds have distinguishable properties. *J. Virol. USA.* 1999; 73(2): 1146-1155.
18. DuBois RM, Aguilar-Yañes JM, Mendoza-Ochoa GI, Oropeza-Almazán Y, Schultz-Cherry S, Alvarez MM, White SW, Russell CJ. The Recepto-Binding domain of influenza virus hemagglutinin produced in *Escherichia coli* folds into its native immunogenic structure. *J. Virol. México.* 2011; 85(2): 865-872.
19. Colma R, Valpuesta JM, Arranz R, et al. The structure of biologically active influenza virus ribonucleoprotein complex. *PLoS pathog. France.* 2009; 5(6): e1000491.
20. Braam J, Ulmanen I, Krug RM. Molecular model of a eukaryotic transcription complex: functions and movements of influenza P proteins during capped RNA-primed transcription. *Cell. Finlandia.* 1983; 34:609-618.
21. Leaver WG, Colman PM, Webster RG. Influenza virus neuroaminidase with hemoagglutinin activity. *Virology. USA.* 1984; 137: 314-323.
22. Flores-Munguía ME, Vázquez-Moreno L, Ramos-Clamont GM. Glicobiología del virus de la influenza A. *Revista Latinoamericana de Microbiología. México.* 2007; 49: 74-87.
23. Palese P, Tobita K, Veda M, Compans RW. Characterization of temperature sensitive influenza mutants defective in neuroaminidase. *Virology. Japan.* 1974; 61: 397-410.
24. Bui M, Whittaker G, Helenius A. Effect of M1 protein in low pH on nuclear transport of influenza virus ribonucleoprotein. *J. Virol. USA,* 1996; 70: 8391-8401.

25. Fehlmann PE, Corre PN, Abarca VK, Godoy MP, Montesinos PL, et al. Búsqueda de la resistencia a amantadina en cepas de un virus de influenza A aisladas en Santiago de Chile, aislados entre los años 2001 y 2002. *Rev. Chil. infect. Chile.* 2005; 22(2): 141-146.
26. Casas GR. La UNAM ante una emergencia sanitaria. Experiencia de la epidemia de la influenza A (H1N1) UNAM. 2010.
27. Chassey B, Aublin-Gex, Ruggieri A, Meyniel-Schiclin L, et al. The Interactomes of Influenza Virus NS1 and NS2 Proteins Identify New Host Factors and Provide Insights for ADAR1 playing and supportive Role in Virus Replication. *PLoS pathog.* Heidelberg Germany. 2013; 9(7): e1003440.
28. Dubois J, Terrier O and Rosa-Calatrava M. Influenza Viruses and mRNA Splicing: Doing More with Less. <http://www.mbio.asm.org>. France. 2014; 5(3): e 00070-14.
29. Neumann G, Hughes TM, Kawaoka Y. Influenza A virus NS1 protein mediates vRNP nuclear export through NES-independent interaction with hCRM1. *The EMBO Journal.* Tokyo Japan. 2000; 19(24): 6751-6758.
30. Kuroda M, Katano H, Nakajima N, et al. Characterization of Quasispecies of pandemic 2009 influenza A virus (A/H1N1/2009) by de novo Sequencing using a next-generation DNA sequencer. *PLoS ONE.* Japan. 2010; 5(4): e10256.
31. Boon ACM, Fringuelli E, Graus YMF, Fouchier RAM, Sintnicolass K, et al. Influenza A virus specific T cell immunity in human during aging. *Virology.* Perugia Italy. 2002; 299: 100-108.
32. Talledo M, Zumaeta K. Los virus Influenza y la nueva pandemia A/ H1N1. *Rev. Per. Biol.* Perú. 2009; 16 27-238.

33. Control y erradicación de la influenza aviar altamente virulenta (IAAV)
<http://www.oirsa.org/aplicaciones/subidoarchivos/BibliotecaVirtual/MANUALIAAV.pdf>
34. Manjarrez ZME, Arenas LG. Virus Influenza: Enigma del pasado y del presente. Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias de México. México. Diciembre 1999; 12: 290-299.
35. Campitelli L, Ciccozzi M, Salemi M, Taglia F, Boros S. H5N1 Influenza evolution: a comparison of different epidemics in bird and humans (1997-2004). J. General Virol. USA. 2005; 87: 955-960.
36. Lu J, Zhang D, Wang G. Highlight the significance of genetic evolution of H5N1 avian flu. Chinese Medical Journal. China. 2006; 119(17): 1458-1464.
37. Reina J. Factores de virulencia y patogenicidad en las cepas gripales (virus influenza tipo A) aviares y humanas. Enfermedades infecciosas; Microbiología Clínica. España. 2002; 20(7): 346-353.
38. Webster RG, Bean WJ, Gorman OT, Chambers TM, Kawaoka Y. Evolution and ecology of influenza A viruses. Microbiol. Rev. Marzo. USA. 1992; 56(1): 152-179.
39. Chang-Chun DL, Huachen Z, Pei-Yu H, Liuxia P, et al. Emergence and evolution of avian H5N2 influenza viruses in chickens in Taiwan. J. Virol. Taiwan. 2014; 88(10):5677.
40. Escorcia M, Carrillo-Sánchez K, March-Mifsut S, Chapa J, Lucio E, Nava GM. Impact of antigenic and genetic drift on the serologic surveillance of H5N2 avian influenza viruses. Veterinary Research. México. 2010; 6:57

41. Ian H. Brown. Summary of avian influenza activity in Europe, Asia, and Africa, 2006–2009. *Avian Diseases*. UK. 2010; 54: 187-193
42. Sanger F, Nicklend S and Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Nati. Acad. Sci. USA*. 1977; Vol. 74, No. 12, pp. 5463-5467.
43. Zhang M, Gaschen B, Blay W, Foley B, Haigwood N, Kuiken C, et al. Tracking global patterns of N-linked glycosylation site variation in highly variable viral glycoproteins: HIV, SIV, and HCV envelopes and influenza hemagglutinin. *Glycobiology*. USA. 2004; 14; 12: 1229-1246.
44. Matrosovich MN, Matrosovich TY, Gray T, Roberts NA, Klenk HD. Human and avian influenza viruses target different cell types in cultures of human airway epithelium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2004; 30; 101:4620-4.
45. Obenauer JC, Denson J, Mehta PK, Su X, Mukatira S, Finkelstein DB. Large-scale sequence analysis of avian influenza isolates. *Science*. USA. 2006; 311; 5767: 1576-1580.
46. D. K. Lvov, M. Yu Shchelkanov, A. G. Prilipov, N. A. Vlasov, I. T. Fedyakina, P. G. Deryabin, S. V. Alkhovsky, T. V. Grebennikova, A. D. Zaberezhny and D. L. Suarez. (2010) Evolution of highly pathogenic avian influenza H5N1 virus in natural ecosystems of northern Eurasia (2005–08). *Avian Diseases*. Greece. 54:s1, 483-495
47. Swiss institute of bioinformatics. The SWISS-MODEL Workspace: A web-based environment for protein structure homology modelling. 2006 [actualizado 2012]: <http://swissmodel.expasy.org/?pid=smh01>.
48. Zimmer SM, Burke DS. Historical perspective-emergence of influenza A (H1N1). *N. Engl. J. Med*. USA. 2009; 361: 279-285.

49. Hoffmann E, Stech J, Guan Y, Webster RG, Perez DR. Universal primer set for the full-length amplification of all influenza A viruses. Arch. Virol. China. 2001; 46:12: 2275-2289.
50. Duckert P, Brunak S, Blom N. Prediction of proprotein convertase cleavage sites. Protein Eng. Des. Sel. Denmark. 2004; 17; 1: 107-112.
51. Abed Y, Goyette N, Boivin G. Generation and characterization of recombinant influenza A (H1N1) viruses harboring amantadina resistance mutations. Quebec Canada. 2005; 49(2):556-559.
52. Center for Biological Sequence Analysis. Prediction of proprotein convertase cleavage sites. Prediction Servers ProP 1.0 Server c2007. Dinamarca: [actualizado: 2007]. CBS ProP 1.0 Server: <http://www.cbs.dtu.dk/services/ProP/>.
53. Center for Biological Sequence Analysis. Prediction of n-glycosilation sites in human proteins. Prediction Servers NetNGlyc 1.0 Server c2011 Dinamarca: [actualizado: 2013] CBS NetNGlyc 1.0 Server: <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>.
54. Li J, Dohna HZ, Cardona CJ, Miller J, Carpenter TE. Emergence and Genetic Variation of Neuraminidase Stalk Deletions in Avian Influenza Viruses. PLoS ONE 2010: 6(2).
55. Castrucci MR, Kawaoka Y. Biologic importance of neuraminidase stalk length in influenza A virus. J of Virol. USA. 1993; 67(2): 759-764.
56. Organización Mundial de la Sanidad Animal (OIE). Manual de las pruebas de diagnostico y de las vacunas para los animales terrestres. http://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Animal_Health_in_the_World/docs/pdf/2.1.14_Gripe_aviar_2007.pdf
57. Ogata T, Yamazaki Y, Okabe N, et al. Human H5N2 avian influenza infection in Japan and the factors associated with high H5N2-neutralizing antibody titer. J Epidemiol. Japan. 2008; 18(4): 160-166.

58. SAGARPA. Situación actual y perspectiva de la producción de carne de pollo en México 1990-1997.
<http://www.sagarpa.gob.mx/ganaderia/Publicaciones/Lists/Estudios%20de%20situacin%20oactual%20y%20perspectiva/Attachments/15/sitpollo97.pdf>
59. FAO. Influenza aviar. Situación en el continente Americano <http://www.rlc.fao.org/es/prioridades/transfron/aviar/paises/mexico.htm>
60. Jiao P, Wei L, Yuan R, Gong L, Cao L, Song Y, Luo K, Ren T and Liao M. Complete Genome Sequence of an H5N2 Avian Influenza Virus Isolated from a Parrot in Southern China. J. Virol. China. 2012; 86(16): 8890-8891.
61. Wood GW, Banks J, Strong I, Parsons G, Alexander DJ. An avian influenza virus of 10 subtype that is highly pathogenic for chickens, but lacks multiple basic amino acids at the haemagglutinin cleavage site. Avian Pathology. UK. 1996; 25:799-806.
62. Salazar MI, López-Ortega O, León-Ávila G. El origen de la variabilidad genética de los virus de la influenza. Gac. Méd. Méx. México. 2010; 196(3): 199-207.
63. Ha Y, Stevens DJ, Skehel JJ, Willey DC. X-ray structures of H5 avian and H9 swine influenza virus hemagglutinins bound to avian and human receptor analogs. Proc. Natl. Acad. Sci. 2001; 98(20): 11181-11186.