



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA
VETERINARIA Y ZOOTECNIA

“ANÁLISIS *in silico* DE LAS
MUTACIONES DE ALTA
PATOGENICIDAD DESCRITAS EN LOS
VIRUS DE INFLUENZA AVIAR.”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
MÉDICO VETERINARIO
ZOOTECNISTA

P R E S E N T A:

SERGIO DAVID RODRÍGUEZ TOLEDANO

Asesor:

Dr. Gary García Espinosa

Ciudad Universitaria, Cd. Mx.

2018





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 mi padre Sergio, mi madre y hermanos:

Cuando deje de ver tu mirada retadora, de sentir tus palmadas alentadoras, de escuchar tus palabras influyentes, de apreciar tu sonrisa motivante, de ser acompañado por tu presencia valiente y de ser protegido por tu amor de padre. Me sentí totalmente derrotado, pero poco a poco reflexione, me levante y mis lágrimas seque, para seguir adelante, simplemente porque me percaté que tú siempre quisiste ver en mí un exitoso hombre, sin importar de haber conocido mis enormes debilidades, tú jamás dejaste de creer en mí y aunque ya no estés aquí, este triunfo es parte de ti, el cual tengo la alegría de compartir con mis hermanos Tania, Elizabeth, Alexis, Nayeli y mi madre Juanita, la cual es un ejemplo de mujer fuerte y valiente, porque aunque su alma sentía desfallecer por tu partida, supo tomar las riendas de esta casa tuya y poco a poco nos fue apoyando en nuestras vidas.

A mis sobrinos Carla, Ari y León:

Ustedes son en mayor parte mi motivación y doy gracias a Dios por permitirme estar con ustedes en cada ocasión.

A mis abuelos:

Gracias a ustedes tuve excelentes padres quienes fueron forjados con extraordinarios valores y sueños.

A mis tíos y mis primos:

Tuve la oportunidad de convivir con personas que saben lo que es superarse y llegar a ser un ejemplo de esfuerzo y dedicación, sin perder la esencia de su origen. Y también con aquellas que tras grandes caídas supieron levantarse más fuerte, teniendo la frente en alto.

A mi maestra Cavy:

Por sus consejos logré de mis mayores dudas salir, por sus regaños conseguí a muchos miedos abatir y gracias a ello estoy más seguro de poder alcanzar las metas que me prometí.

AGRADECIMIENTOS

A Dios por abrirme los caminos, ser mi apoyo en cada caída y empujarme cada vez que sentía retroceder en mi vida.

A la UNAM por permitirme ser parte de ella.

Al Dr. Gary García Espinosa, con gran agradecimiento por su paciencia y tiempo que dedico para dirigir este trabajo, y que de ante mano siempre le guardare gran admiración y respeto.

A cada uno de mis sinodales M. en C. Rolando Beltrán Figueroa, M. en C. María del Carmen Mercado García, Dra. Gabriela Guadalupe Gómez Verduzco y Dr. Arturo Cortes Cuevas por sus comentarios y sugerencias, que permitieron mejorar este trabajo.

A la Dra. Segundo y al Dr. Ledesma, los cuales fueron durante la carrera una pieza clave en la fijación de mis metas académicas.

A la M. en C. Magdalena Escorcía, al Dr. J. Antonio Quintana y al Dr. Rubén Merino, quienes me prestaron un poco de su valioso tiempo para orientarme cuando me sentía perdido.

A Tania por ser una gran compañera desde el inicio de la carrera hasta el final del servicio social donde su apoyo fue incondicional.

A Carlos por ser tu buen compañerismo durante las clases y en las guardias.

A Itzel, Arturo y Ximena por acompañarme en momentos difíciles y apoyarme.

A Virgina, David, Shayra, José L., Jesús, Guillermo, Ericka, Oscar, Nadia, Fernando, Graciela y Gabriela, que aunque desafortunadamente los conocí en estos últimos años, hicieron que mi estancia en el DMZA fuera más emotiva.

Al Fis. Juan R. Sánchez quien me dio la oportunidad de entrar al museo Universum por el cual pude crecer como profesional y persona, al igual que mis compañeros que fueron parte de grandes historias emocionantes en mi paso por la sala de química.

Y a todas las personas que durante mi camino hasta aquí me enseñaron grandes lecciones, me dieron buenos consejos, me escucharon en su momento y me tendieron la mano cuando la necesitaba.

*“Si una persona es perseverante, aunque sea dura de entendimiento, se
hará inteligente; y aunque sea débil se transformará en fuerte”*

Leonardo Da Vinci

CONTENIDO

| | |
|--|----|
| RESUMEN | 1 |
| I. INTRODUCCIÓN..... | 3 |
| I.I. Características del virus de la influenza y su genoma..... | 3 |
| I.II. Implicaciones del virus en la avicultura y en la salud pública..... | 4 |
| I.III. Aspectos evolutivos del virus de la Influenza Aviar..... | 5 |
| I.IV. La Hemoaglutinina..... | 5 |
| I.V. Mutaciones..... | 6 |
| II. JUSTIFICACIÓN | 8 |
| III. HIPÓTESIS | 8 |
| IV. OBJETIVO | 8 |
| V. MATERIAL Y MÉTODOS | 9 |
| V.I. Mutaciones asociadas a la alta patogenicidad..... | 9 |
| V.II. Genomas..... | 9 |
| V.III. Alineamiento de genomas..... | 9 |
| V.IV. Identificación de las mutaciones asociadas a la patogenicidad..... | 10 |
| V.V. Análisis de las mutaciones..... | 10 |
| VI. RESULTADOS..... | 11 |
| VI.I. Mutaciones obtenidas a partir de la literatura..... | 11 |
| VI.I.I. Naturaleza de las mutaciones..... | 11 |
| VI.I.II. Proteínas implicadas..... | 11 |
| VI.II. Genomas obtenidos..... | 11 |
| VI.II.I. Información general de las cepas utilizadas..... | 12 |
| VI.II.II. Disponibilidad de las secuencias proteicas..... | 13 |
| VI.III. Análisis de las secuencias proteicas con base a las mutaciones asociadas a la patogenicidad..... | 13 |
| VI.III.I. Polimerasa Básica 2 (PB2) | 13 |
| VI.III.II. Polimerasa Básica 1 (PB1) | 14 |
| VI.III.III. Polimerasa Acida (PA) | 17 |
| VI.III.IV. Polimerasa Acida X (PA-X)..... | 22 |
| VI.III.V. Hemoaglutinina (HA) | 23 |
| VI.III.VI. Nucleoproteína (NP) | 37 |
| VI.III.VII. Neuraminidasa (NA) | 47 |

| | |
|--|-----|
| VI.III.VIII. Proteína de Matriz 1 (M1) | 52 |
| VI.III.IV. Proteína no estructural 1 (NS1) | 57 |
| VII. DISCUSIÓN | 77 |
| VIII. CONCLUSIONES | 84 |
| IX. REFERENCIAS..... | 86 |
| ANEXOS | 96 |
| I. Mutaciones que intervienen en la expresión de la patogenicidad reportadas a partir de evidencia experimental..... | 97 |
| II. Cepas utilizadas para realizar el análisis bajo los criterios establecidos en la metodología..... | 99 |
| III. Mapa geográfico que representa los puntos donde se aislaron las cepas utilizadas en el análisis..... | 100 |
| IV. Claves de las cepas y sus secuencias disponibles en el GenBank..... | 101 |
| V. Identificación y clasificación de los aminoácidos..... | 102 |

LISTA DE FIGURAS Y CUADROS

| | |
|---|----|
| Figura 1: Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de la Polimerasa Básica 1 de los VIAAP donde se indica las posiciones 14 y 38 cuyas mutaciones por sustitución están asociadas al incremento de la patogenicidad..... | 16 |
| Figura 2: Alineamientos de las secuencias de aminoácidos de la Polimerasa Ácida en la posición 672 y de las secuencias de aminoácidos de la Nucleoproteína en el sitio 374 de los VIAAP asociados a una patogenicidad de tipo consenso..... | 18 |
| Figura 3: Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de la Hemoaglutinina en las posiciones 308 y 338 de los VIAAP asociados a una patogenicidad de tipo consenso. | 19 |
| Figura 4: Alineamientos de las secuencias de aminoácidos de la proteína M1 en los sitios 89 y 101, y de las secuencias de aminoácidos de la proteína M2 en la posición 45 asociados a una patogenicidad de tipo consenso..... | 21 |
| Figura 5: Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de la Polimerasa Ácida X de los VIAAP cuya presencia está asociada a la disminución de la patogenicidad en pollos y en ratones. | 23 |
| Figura 6: Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de la HA de los subtipos H5 en el sitio 13 asociada al incremento de la patogenicidad | 25 |
| Figura 7: Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de la HA de los subtipos H7 en el sitio 188 asociada al aumento de la patogenicidad | 27 |

| | |
|---|----|
| Figura 8: Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de la Hemoaglutinina de los subtipos H7 en el sitio 123 y 149, y cuyos puntos de N-glicosilación están asociados al incremento de la patogenicidad | 29 |
| Figura 9: Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de la Neuraminidasa en la región del extremo terminal de los VIAAP que a su vez presentaron los sitios de N-glicosilación 123 y 149, y que cuya presencia asociados al aumento de la virulencia | 30 |
| Figura 10: Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de la Hemoaglutinina de los subtipos H5 en la posición 346 relacionada al incremento de la patogenicidad | 31 |
| Figura 11: Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de la HA de los subtipos H7 en los sitios 227 y 388 asociados a una patogenicidad de tipo consenso...33 | 33 |
| Figura 12: Alineamientos de las secuencias de aminoácidos de la Polimerasa Básica 2 y de las secuencias de aminoácidos de la PB1 en los sitios 123 y 16 respectivamente, y que asociadas a una patogenicidad de tipo consenso | 34 |
| Figura 13: Alineamientos de las secuencias de aminoácidos de la proteína M1 y de las secuencias de aminoácidos de la proteína M2 en las posiciones 228 y 46 respectivamente asociadas a una patogenicidad de tipo consenso. | 35 |
| Figura 14: Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de la HA del subtipo H7 en los sitios 436, 450 y 536, asociados a una patogenicidad de tipo consenso | 37 |
| Figura 15: Alineamientos de las secuencias de aminoácidos de la Nucleoproteína y de las secuencias de aminoácidos de la proteína NS1 en las posiciones 184 y 148 respectivamente asociadas a una patogenicidad de tipo consenso | 39 |
| Figura 16: Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de la Nucleoproteína en el sitio 109 asociado al incremento de la virulencia | 41 |
| Figura 17: Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de la NP en la posición 105 relacionada al aumento de la patogenicidad..... | 43 |
| Figura 18: Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de la NP en los sitios 50 y 98 asociados a una patogenicidad de tipo consenso..... | 46 |
| Figura 19: Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de la Neuraminidasa en la región terminal | 52 |
| Figura 20: Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de la proteína M1 en los sitios 37, 95, 224 y 242, y alineamiento de las secuencias de aminoácidos de la proteína M2 en la posición 21 que en conjunto están relacionados a una patogenicidad de tipo consenso | 54 |
| Figura 21: Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de la proteína M1 en el sitio 43 asociado al incremento de la virulencia | 56 |
| Figura 22: Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de la proteína NS1 en la posición 149 relacionada al aumento de la patogenicidad..... | 58 |

| | |
|--|----|
| Figura 23: Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de la proteína NS1 en las regiones 78-92 y 191-200, donde la mutación por eliminación de los aminoácidos 196-200 está asociada a la atenuación de la virulencia | 60 |
| Figura 24: Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de la proteína NS1 en la región 78-92 relacionado a una patogenicidad de tipo consenso. | 64 |
| Figura 25: Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de la proteína NS1 en la región carboxilo terminal asociado a una variación en la virulencia..... | 67 |
| Figura 26: Número de mutaciones presentes en los aislados virales del subtipo H5 que presentaron secuencias proteicas disponibles y completas..... | 75 |
| Figura 27: Número de mutaciones presentes en los aislados virales del subtipo H7 que presentaron secuencias proteicas disponibles y completas..... | 75 |
| | |
| Cuadro 1: Mutaciones que modifican la patogenicidad de los virus de influenza aviar..... | 68 |
| Cuadro 2: Mutaciones presentes en cada uno de los aislados virales de influenza aviar de alta patogenicidad | 71 |
| Cuadro 3: Número de mutaciones presentes en las 32 cepas del subtipo H5 con los respectivos porcentajes. | 72 |
| Cuadro 4: Número de mutaciones presentes en las 28 cepas del subtipo H7 con los respectivos porcentajes. | 73 |

ABREVIATURAS

| | |
|------------|--|
| ARN | Ácido ribonucleico |
| dpi | Días post-inoculación |
| IPIC | Índice de patogenicidad intracerebral |
| IPIV | Índice de patogenicidad intravenosa |
| nt | Nucleótido |
| OIE | Organización Mundial de Sanidad Animal |
| OMS | Organización Mundial de la Salud |
| P1,P2 y P3 | Número de pases de la cepa en embrión de pollo |
| SE | Sitio de escisión |
| TMP | Tiempo de muerte promedio |
| VIAAP | Virus de influenza aviar de alta patogenicidad |
| VIABP | Virus de influenza aviar de baja patogenicidad |
| Δ | Incompleto |

RESUMEN

SERGIO DAVID RODRÍGUEZ TOLEDANO. Análisis *in silico* de las mutaciones de alta patogenicidad descritas en los virus de influenza aviar (bajo la dirección de: Dr. Gary García Espinosa).

Los Influenza virus A son de los virus más desafiantes que amenazan a la salud de las aves domésticas por su gran capacidad de adaptarse a partir de las aves acuáticas silvestres, de recombinarse y de provocar gran morbilidad y mortalidad en la industria avícola. Según la OIE establece que un virus de influenza aviar se le clasifica de alta patogenicidad si cumple con dos criterios principales, los cuales son presentar sitio de escisión polibásico (más de dos aminoácidos básicos) situado en la Hemoaglutinina y demostrar un índice de patogenicidad intravenoso superior a 1.2 (matar a más del 75% de los pollos de prueba en un periodo no mayor a 10 días).

El objetivo del trabajo fue llevar a cabo el estudio de las secuencias proteicas provenientes de los virus de influenza aviar de alta patogenicidad que sin importar su origen (año, lugar y especie de ave donde se aisló) se identifiquen a través del análisis *in silico* las mutaciones consenso que se han asociado al incremento de la virulencia en las aves de corral.

Para realizar el análisis, se necesitó hacer la búsqueda bibliográfica de las mutaciones relacionadas a la alta patogenicidad en la base de datos de Scopus y PubMed. Posteriormente la obtención de secuencias de aminoácidos de las proteínas provenientes de virus catalogados de alta patogenicidad y subsecuentemente el alineamiento de las secuencias utilizando el programa mega v7 como herramienta de bioinformática para verificar la presencia de cada mutación.

Se obtienen resultados que confirman que al compararse los virus, estos muestran una gran discrepancia en cuanto a cantidad de mutaciones, asegurando que en mayor parte las mutaciones reportadas con base experimental son propias de cada cepa viral, donde principalmente actúan en conjunto.

El análisis indica que no se puede proceder a la estructuración de una nueva herramienta diagnóstica de tipo molecular para identificar el nivel de patogenicidad de una cepa, debido a que los virus de influenza aviar de alta patogenicidad no presentan los mismos marcadores de virulencia reportados en la literatura experimental de forma homogénea y por otro lado se necesita de más evidencia experimental que englobe a las únicas mutaciones por sustitución que aparecieron de manera constante en todos los aislados virales.

Palabras clave: mutaciones, análisis *in silico*, virus de influenza aviar de alta patogenicidad.

I. INTRODUCCIÓN

I.I. Características del virus de la influenza y su genoma

La familia Orthomyxoviridae contiene siete géneros: Influenzavirus A, B, C, D, Quaranjavirus, Thogotovirus e Isavirus. ¹ **El género Influenzavirus A** infecta a distintas especies de aves y causa la enfermedad de influenza aviar.² Son virus envueltos de tipo ARN de cadena sencilla de sentido de codificación negativo.^{3,4} El genoma se distribuye a través de ocho segmentos que en su conjunto codifican al menos 11 proteínas virales: el segmento 1 codifica para la polimerasa básica 2 (PB2), el segmento 2 codifica para la polimerasa básica 1 (PB1) y en algunos aislamientos a la proteína asociada a la mitocondria (PB1-F2), el segmento 3 codifica a la polimerasa ácida (PA) y en algunas cepas la proteína de fusión PA-X, el segmento 4 codifica la glicoproteína de hemoaglutinina (HA), el segmento 5 codifica la nucleocápsida (NP), el segmento 6 codifica la neuraminidasa (NA), el segmento 7 a la proteína de matriz (M1 y M2), y el segmento 8 a la proteína no estructural 1 (NS1) y la proteína de exportación nuclear.^{5,6} Las distintas proteínas del virus se han clasificado en tres categorías principales: 1) proteínas de la envoltura (HA, NA y M2); 2) proteínas internas que son la polimerasa (las subunidades PB2, PB1, PA), NP, M1, NS1 y NEP; y 3) proteínas no estructurales NS1 y PB1-F2.^{4,7}

Los virus de influenza tipo A se clasifican en subtipos con base en las propiedades antigénicas de la glicoproteína HA y NA. Actualmente se conocen 18 HA y 11 NA, creando diferentes combinaciones entre ellas, pero en aves están presentes las combinaciones de la HA1 a la HA16 y NA1 a la NA9.⁸ La mayoría de los subtipos de los virus de influenza aviar (VIA) que afectan a las

aves son de baja patogenicidad, pero los subtipos H5 y H7 pueden evolucionar hacia alta patogenicidad ⁹

I.II. Implicaciones del virus en la avicultura y en la salud pública

La presencia de subtipos con H5 y H7 en aves son de reporte obligatoria a la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) debido a que causan alta morbilidad, mortalidad, son de rápida diseminación y pueden ser zoonosis. Por su patogenicidad se dividen en virus de influenza aviar de baja patogenicidad (VIABP) y alta patogenicidad (VIAAP). Los VIABP causan enfermedad leve a moderada en pollos, pero pueden llegar a ser altamente patógenos en pollos después de un contacto prolongado con el virus dentro de la granjas, ¹⁰ mientras que los VIAAP causan enfermedad grave con alta mortalidad y se propagan rápidamente en cortos períodos de tiempo causando elevadas pérdidas económicas. En algunos casos, estos virus podrían representar una potencial amenaza contagiosa para los mamíferos, incluyendo a los humanos. ¹¹ Con base a la OIE los VIABP son aquellos que tienen un índice de patogenicidad intravenosa (IPIV) menor a 1.2 en pollos de 6 semanas de edad o menos del 75% de mortalidad en pollos de 4 a 8 semanas infectados por vía intravenosa, así como la ausencia de múltiples aminoácidos básicos en el sitio de escisión de la proteína HA.¹²

El listado de enfermedades y plagas exóticas y endémicas de notificación obligatoria de los animales terrestres y acuáticos, publicado en el Diario Oficial de la Federación el día 4 de mayo 2016, enlista a los subtipos H5 y H7 o cualquiera de los virus de influenza aviar con un índice de patogenicidad intravenoso (IPIV) superior a 1.2 como virus de notificación inmediata obligatoria a las dependencias oficiales de salud animal y sanidad avícola del país, al Análisis *in silico* de las mutaciones de alta patogenicidad descritas en los virus de influenza aviar

Sergio David Rodríguez Toledano

pertenecer al grupo 1, el cual está compuesto por enfermedades y plagas que no se encuentran en el territorio nacional o que han sido erradicadas del país.¹³

I.III. Aspectos evolutivos del virus de la Influenza Aviar

La ARN polimerasa es propensa a provocar cambios en el genoma del VIA, dando una variación antigénica constante; lo anterior es una característica de la evolución continua del virus en la naturaleza para evadir la respuesta inmune del huésped y permitir la reinfección.⁷ Chen R, (2006) evaluó estos cambios mediante la tasa de sustitución de nucleótidos en los 8 segmentos del genoma en una amplia variedad de VIA. Las tasas observadas fueron de $>1 \times 10^{-3}$ sustituciones por sitio y por año. Por lo tanto, el virus de la influenza A exhibe una dinámica evolutiva rápida en todo su rango de hospedadores, consistente con una alta tasa de mutación y una rápida replicación.¹⁴

Es aceptado internacionalmente que los VIAAP H5 y H7 emergen de precursores poco patógenos después de que estos últimos hayan sido introducidos en aves domésticas. Este supuesto es apoyado por trabajos que demostraron que los VIAAP no forman un linaje filogenético separado de los VIABP y siempre tienen como ancestro común a VIA en aves acuáticas silvestres y domésticas.¹⁵

I.IV. La Hemoaglutinina

La HA es la principal glicoproteína constitutiva de la envoltura de los virus de influenza A, que a su vez se produce como una proteína precursora (HA0) que se escinde por proteasas del huésped para generar dos subunidades, HA1 y HA2 para convertirla en una estructura funcional. Esta escisión es esencial para la infectividad del virus a nivel celular.¹⁶

Los VIABP están restringidos a la replicación en las células epiteliales que recubren el tracto respiratorio e intestinal; Las proteasas que escinden la hemoaglutinina son principalmente de tipo tripsina presentes en estos tejidos. La HA0 de los VIAP (subtipos H5 y H7) es escindible por proteasas de tipo furina y subtilisina, presentes en una variedad mucho más amplia de tejidos, dando lugar a la replicación multiorgánica del virus y una mayor patogenicidad. Los subtipos H5 y H7 adquieren los sitios multibásicos en HA 0 que definen los VIAAP, y la secuencia de aminoácidos en HA 0 se determina de forma rutinaria durante la identificación del subtipo viral para propósitos de tipificación por lesiones (patotipificación) y la presentación de informes oficiales. ¹⁷

La infección de las células epiteliales de las vías respiratorias se inicia por la unión de la hemoaglutinina a los glicoconjugados de la superficie celular. El virus de influenza humano y porcino se une preferentemente al ácido siálico (N-acetilneuramínico) con un enlace $\alpha 2,6$, mientras que la mayoría de los virus de influenza aviar tienen preferencia por el ácido siálico con un enlace $\alpha 2,3$. ¹⁸

I.V. Mutaciones

El cambio de VIABP a VIAAP ha sido posible por una serie de mecanismos que incluyen; 1) sustituciones de aminoácidos no básicos por aminoácidos básicos (arginina o lisina) en la HA; ^{19,20} 2) inserciones de múltiples aminoácidos básicos a partir de codones duplicados o triplicados del punto de escisión de la HA, por un fallo de la transcripción del complejo de polimerasa; ^{17,19,21} 3) insertos cortos de aminoácidos básicos y no básicos de origen desconocido en la HA; 4) recombinación no homóloga que da como resultado la inserción de una secuencia de nucleótidos de “purinas” al sitio de escisión de HA ^{17,22}; y 5) pérdida de glucosilación en el residuo 13 en combinación con múltiples aminoácidos

Análisis *in silico* de las mutaciones de alta patogenicidad descritas en los virus de influenza aviar
Sergio David Rodríguez Toledano

básicos en el punto de escisión de la HA.^{17,23} La secuenciación de aminoácidos en la región de escisión de los aislamientos del VIA subtipos H5 y H7 levemente patógenas en las aves permitiría identificar los virus que tienen la capacidad de convertirse en muy patógenos para las aves de corral después de una mutación.¹⁷ Típicamente la secuencia de nucleótidos de escisión de los VIABP tienen solo dos aminoácidos básicos, en las posiciones -1 y -4 desde el sitio de escisión para el H5 y en las posiciones -1 y -3 para el subtipo H7.²⁴ mientras que los VIAAP tienen como mínimo la secuencia RXR / KR.²⁵

En las últimas tres décadas, se han desarrollado técnicas de genética inversa para identificar marcadores genéticos asociados a la virulencia del virus de influenza aviar.²⁶ Estas técnicas han demostrado la existencia de otras mutaciones diferentes a la acumulación de aminoácidos básicos en la HA en distintos genes de los virus de influenza aviar y en diferentes aislamientos virales que provocan una elevada tasa de mortalidad en las poblaciones de aves de corral.^{27,28}

II. JUSTIFICACIÓN

El diagnóstico molecular de los VIA de alta patogenicidad del subtipo H5 o H7 se lleva cabo principalmente por la presencia de la acumulación de aminoácidos básicos en el sitio de corte de la HA ^{2,17}, sin embargo se han descubierto otras mutaciones en los diferentes segmentos del genoma del virus de influenza aviar en los últimos años las cuales modifican la patogenicidad del virus, por lo que se pretende responder la pregunta: ¿cada uno de los virus de alta patogenicidad que afectan a las aves tiene las mismas mutaciones que le confieren la alta patogenicidad?

III. HIPÓTESIS

Los genomas de los virus de alta patogenicidad de las aves reportadas internacionalmente comparten mutaciones de aminoácidos que aumentan su virulencia sin consideración del año, lugar ó especie de ave doméstica y silvestre donde se aisló.

IV. OBJETIVO

identificar *in silico* las mutaciones en los aminoácidos que aumentan la patogenicidad descritas para los virus de influenza de alta patogenicidad que afectan a las aves de corral, y con ello localizar mutaciones consenso que podrían ser propuestas para el diagnóstico molecular.

V.MATERIAL Y MÉTODOS

V.I. Mutaciones asociadas a la alta patogenicidad.

Se hizo un metanálisis utilizando las bases de datos del PubMed- NCBI y Scopus respecto de las mutaciones de aminoácidos de los virus de influenza tipo A que se ha demostrado experimentalmente que causan alta patogenicidad en aves sin importar el subtipo, año de aislamiento, especie de ave que infectan y si son zoonosis. Se hizo el uso de palabras clave (keywords en inglés) para la búsqueda: avian influenza mutation, avian influenza mutation H5, avian influenza mutation H7.

V.II. Genomas.

Se seleccionaron los genomas completos de subtipos de alta patogenicidad reportados ante la OIE y que estuvieron disponibles en las bases de datos del GenBank del NCBI.

V.III. Alineamiento de genomas.

Cada uno de los ocho segmentos que conforman el genoma del virus fue alineado con sus segmentos homólogos utilizando el software Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 (MEGA v7). Se hará uso a su vez del programa ClustalW cuando sea necesario identificar con exactitud la pérdida y/o inserciones de aminoácidos en las secuencias.

V.IV. Identificación de las mutaciones asociadas a la patogenicidad.

Se localizaron las distintas mutaciones de aminoácidos que hayan sido demostradas experimentalmente en cada uno de los ocho segmentos de los aislamientos virales mediante el alineamiento de secuencias de aminoácidos por segmento del genoma.

V.V. Análisis de las mutaciones.

Se interpretaron los resultados con base al porcentaje de aquellas mutaciones que sean consenso en los segmentos del VIA de alta patogenicidad.

VI. RESULTADOS

VI.I. Mutaciones obtenidas a partir de la literatura.

Después de realizar la búsqueda bibliográfica digital se encontraron 41 mutaciones de diferente naturaleza (sustitución, eliminación e inserción) que impactaban a la estructura de las proteínas PB2, PB1, PA, PA-X, HA, NP, NA, M1, M2 y NS1, y a su vez incrementaban o atenuaban la patogenicidad de los diferentes virus que se utilizaron como referencia en cada trabajo experimental (Ver Anexo I). La literatura científica que aportó cada mutación importante va desde el año de 1986 a 2017. Durante la búsqueda la conexión que existía entre los trabajos científicos fue imprescindible para la obtención de los mismos.

VI.I.I. Naturaleza de las mutaciones.

La naturaleza que predominó fue la de tipo “sustitución”, ya que de las 41 mutaciones que se recabaron, 35 son por sustitución, 5 son por eliminación y 1 por inserción (ver Anexo I).

VI.I.II. Proteínas implicadas.

El número de mutaciones que se obtuvieron por proteína fue la siguiente:

- | | | |
|------------------|-----------------|-----------------|
| • PB2: 1 | • HA: 12 | • M1: 8 |
| • PB1: 3 | • NP: 6 | • M2: 3 |
| • PA: 1 | • NA: 1* | • NS1: 5 |
| • PA-X: 1 | | |

*La proteína NA presentó mutaciones por eliminación que diferían en el número de aminoácidos pero se toman como uno mismo, porque se concluyó que finalmente provocaban el mismo resultado (28–31) (ver Anexo I).

VI.II. Genomas obtenidos

En la página oficial de la OIE se dispone de informes sobre brotes a partir del año 2004 ya sea de seguimiento o de emergencia, en los cuales no se mencionan la identificación de los virus aislados de los brotes reportados

Análisis *in silico* de las mutaciones de alta patogenicidad descritas en los virus de influenza aviar
Sergio David Rodríguez Toledano

aplicando el sistema de nomenclatura dictado por la OMS en 1980 el cual consiste en: *Tipo / Especie / Región geográfica de origen / Identificación de laboratorio / Año de aislamiento / (HA y NA descritos por la letra y número)* ²⁹,

Por consiguiente la identificación de los virus se menciona en investigaciones posteriores relacionadas a la OIE, donde se realiza precisamente la caracterización de cepas virales emergentes de influenza en poblaciones animales poniendo como ejemplo los trabajos llevados a cabo por la red de expertos en influenza animal (OFFLU), logrando facilitar la búsqueda de las secuencias proteicas en el GenBank (ver Anexo II). La selección del mayor número de aislamientos virales, fue determinada por: 1) la disponibilidad total de sus secuencias proteicas; 2) la patogenicidad de cada cepa, la cual debe estar reportada con base experimental y a su vez clasificada de alta patogenicidad; 3) abarcar todos los subtipos de H5 y H7 con alto impacto en la industria avícola (H5N1, H5N2, H5N6, H5N8, H7N8, H7N9, etc.). Obteniendo una cantidad total de 60 cepas, las cuales son una muestra representativa de los VIAAP.

VI.II.I. Información general de las cepas utilizadas

De los 60 virus, 32 son del subtipo H5 y 28 del subtipo H7. La mayoría participaron en grandes brotes a lo largo de la historia que va desde 1934 a 2017 de distintas zonas geográficas dentro de los siete continentes ^{9,30-32} siendo Alexander DJ, et al. (2009) que describen los principales ³³. Mientras que otras cepas fueron recabadas a partir de artículos de tipo experimental que hicieron uso de las pruebas establecidas por la OIE. Disponiendo de virus aislados de diferentes aves, y también de cerdos, ya que cumplen con los criterios para la clasificación de VIAAP. ^{2,17} (ver Anexo II y III).

VI.II.II. Disponibilidad de las secuencias proteicas

De forma general no se obtuvo todas las secuencias proteicas de todos los virus en la base de datos del banco de genes, a excepción de la proteína M1 teniendo el 100% de disponibilidad. En el caso de las proteínas PB1-F2 y PA-X fueron las más bajas con un porcentaje de disponibilidad en promedio de 61.66% y 20% respectivamente (ver Anexo IV).

VI.III. Análisis de las secuencias proteicas con base a las mutaciones asociadas a la patogenicidad.

VI.III.I. Polimerasa Básica 2 (PB2)

La replicación y la transcripción del virus de la gripe son catalizadas por el complejo de la polimerasa viral, compuesto por las proteínas PB2, PB1 y PA. Aunque las tres subunidades de la polimerasa afectan la virulencia de la influenza, el PB2 es el principal determinante de la polimerasa para la virulencia de la influenza y el rango de hospedadores y, por lo tanto, para la adaptación del virus de la influenza a nuevos huéspedes.³⁴⁻³⁷ Arai Y. et al. (2016) mencionan que la mutación de la polimerasa de adaptación humana más conocida es la sustitución PB2-E627K, que está presente en la mayoría de los virus humanos estacionales, excepto en el virus pandémico H1N1 2009, también en algunos aislados humanos H5N1 y H7N9, y un aislamiento humano H7N7. La mutación PB2-E627K se correlaciona con la alta virulencia del virus H5N1 en ratones y permite que el virus se replique de manera eficiente en el tracto respiratorio superior del ratón.³⁷ Además, las mutaciones PB2-D701N y PB2-Q591K son las que también se han encontrado en mayor medida y que aumentan la replicación del virus de la gripe en huéspedes mamíferos.^{35,36,38}

No se dispuso de evidencia experimental donde se haya demostrado una mutación en específico que tenga relación directa con el aumento de la virulencia en pollos de forma trascendente, por ejemplo Tada T. et al. (2011) trabajaron con A / chicken / Yamaguchi / 7/2004 (H5N1) y A / pato / Yokohama / aq10 / 2003 (H5N1), siendo la primera más patógena que la segunda y al intercambiar sus PB2, logró disminuir la patogenicidad en pollos de A / chicken / Yamaguchi / 7/2004 (H5N1),³⁹ sin embargo en el estudio no se demostró que tipo de mutación en los aminoácidos son los responsables del comportamiento del virus menos patógeno, y cuando se comparó las secuencias de las dos PB2, se observó una diferencia de 10 aminoácidos, la cepa A / chicken / Yamaguchi / 7/2004 contiene en las siguientes posiciones: 9D, 64I, 66M, 67V, 108A, 339T, 340K, 453P, 615I, 731V, mientras que la cepa A / pato / Yokohama / aq10 / 2003 en su secuencia tiene en esas posiciones: 9N, 64M, 66I, 67I, 108T, 339K, 340R, 453S, 615M, 731M, con estos datos se describe mutaciones por sustitución, las cuales no estaban situadas en una sola región.

VI.III.II. Polimerasa Básica 1 (PB1)

Suzuki Y, et al (2014) trabajaron con dos cepas: A/whistling swan/Shimane/580/2002 (H5N3) y A/chicken/Yokohama/aq55/2001 (H9N2) de tipo salvaje y de baja patogenicidad respectivamente, cuyas HA y NA fueron remplazadas por las de la cepa A / chicken / Yamaguchi / 7/2004 (H5N1) que es de alta patogenicidad. Posteriormente al sustituir la C38Y en PB1 de la cepa recombinante A/whistling swan/Shimane/580/2002 aumento tanto la actividad de la polimerasa en células DF-1 (una línea celular derivada de fibroblastos de pollo) *in vitro* como la patogenicidad en pollos (se acorto el tiempo medio de supervivencia de 3.39 dpi a 2.25 dpi), mientras que la cepa recombinante

A/chicken/Yokohama/aq55/2001 se le sustituyó V14A en PB1 causando una reducción de la actividad de la polimerasa pero no afectó la patogenicidad en pollos. Fue interesante observar que la sustitución de V14A redujo la transmisión viral en pollos. Estos estudios demostraron que la actividad aumentada de la polimerasa se correlaciona directamente con la patogenicidad potenciada, mientras que la actividad de la polimerasa disminuida no siempre se correlaciona con la patogenicidad, requiriendo un análisis adicional ⁴⁰.

Estos cambios moleculares necesitaron ser identificados dentro de las cincuenta seis secuencias disponibles de la PB1 para determinar la presencia de ambas mutaciones por sustitución, eligiendo las secuencias de la PB1 de todos los aislamientos virales y su relación con la alta patogenicidad, tomando como referencia el aislamiento A/chicken/Yokohama/aq55/2001 y A/whistling swan/Shimane/580/2002 para la búsqueda de los aminoácidos Tirosina y Valina en las posiciones 38 y 14 respectivamente.

➤ Mutación por sustitución A14V

Respecto a las cincuenta y seis secuencias alineadas de PB1, cuarenta y seis (82.14%) de estas no utilizan el marcador de virulencia 14V ya que poseen alanina en la posición 14 (Figura 1). En el trabajo de Suzuki Y, et al. (2014) se aclara que la presencia de valina no es indispensable para el comportamiento patógeno en pollos, solo se afecta la transmisibilidad por la actividad de la polimerasa.⁴⁰ Realmente se debe profundizar más en las mutaciones que mejoran o afectan la trasmisión, ya que la mayoría de los VIAAP analizados fueron recuperados de brotes.

➤ Mutación por sustitución C38Y

El alineamiento de las cincuenta y seis secuencias de PB1 demuestra que todas (100%) contienen tirosina en la posición 38. Este marcador se asocia a muerte aguda en los pollos ⁴⁰. Por lo que es una mutación por sustitución conservada en todos los VIAAP, considerándose a su vez un marcador importante asociado a la virulencia.

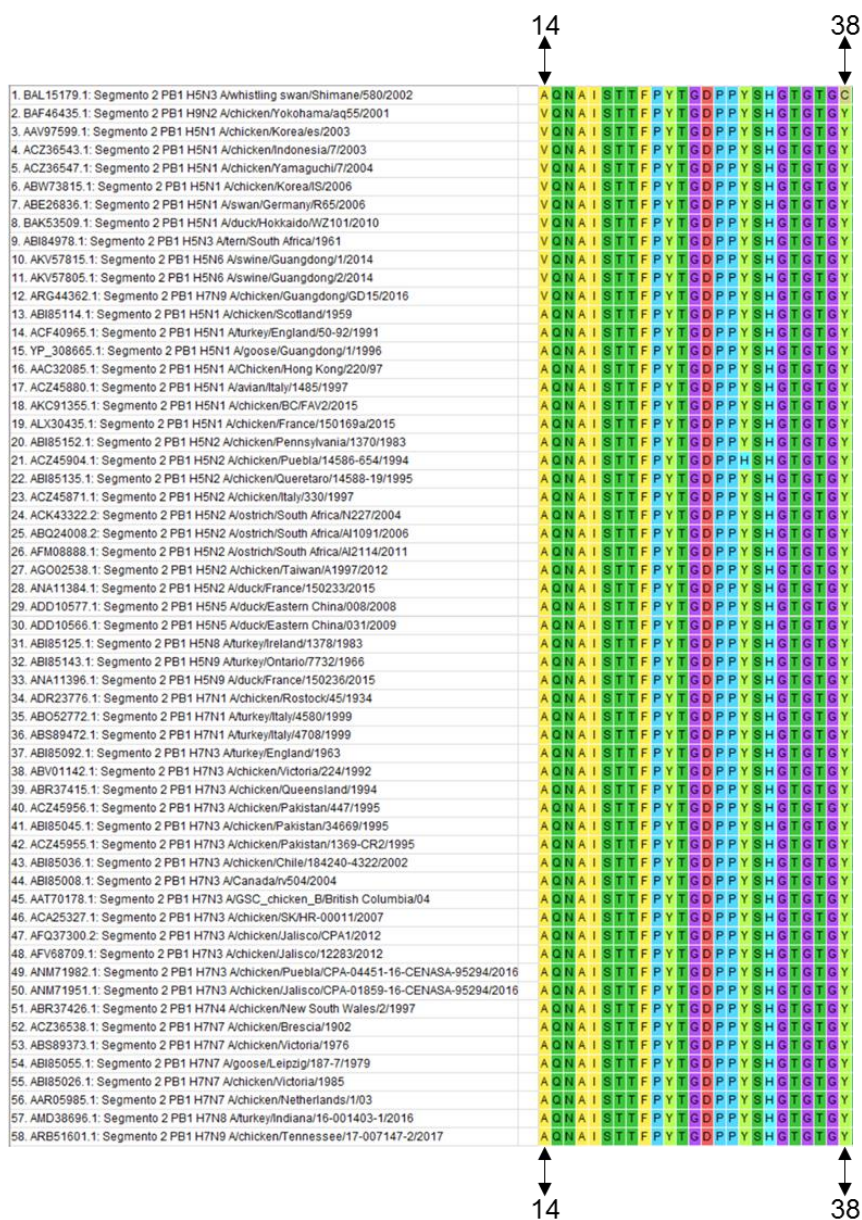


Figura 1: Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de la Polimerasa Básica 1 de los VIAAP donde se indica las posiciones 14 y 38 cuyas mutaciones por sustitución están asociadas al incremento de la patogenicidad. En la parte superior se observan las dos cepas de referencia A/whistling swan/Shimane/580/2002 (H5N3) y A/chicken/Yokohama/qa55/2001 (H9N2).

Análisis *in silico* de las mutaciones de alta patogenicidad descritas en los virus de influenza aviar
Sergio David Rodríguez Toledano

VI.III.III. Polimerasa Acida (PA)

En este segmento no se encontró evidencia experimental donde se haya demostrado una sola mutación en específico que tenga relación directa con el aumento de la virulencia en pollos. Yamamoto N, et al. (2013) modificaron la cepa de baja patogenicidad A / duck / Hokkaido / Vac-1/2004 (H5N1), insertándole dos aminoácidos básicos en el sitio de escisión, posteriormente al inocularlo por vía intranasal en pollos, se percataron que su patogenicidad apenas se había diferenciado con respecto al virus original. Decidieron darle pases en embrión de pollo por tres ocasiones, nuevamente al inocularlo en pollos, su patogenicidad era la misma que la de una cepa de AP. La secuenciación de nucleótidos de sus segmentos, mostró después de la traducción cambios de aminoácidos en las proteínas en las siguientes posiciones: PA L672F, HA H308Q y una inserción de Arginina en la posición 338, NP M374V, M1 D89N y R101K, M2 R45H. Procedieron a la creación de virus recombinantes, destacando la importancia de que estas mutaciones por sustitución y una por inserción, funcionan de manera sinérgica, y que M2 45H tiene una participación sinérgica con otras mutaciones para aumentar la patogenicidad del virus en las aves ⁴¹, Veits J, et al (2012) mencionaron que en la proteína M2 la histidina en la posición 45 está presente en aislamientos virales de alta patogenicidad ⁴². Se dispuso a la comparación para comprobar la existencia de estas mutaciones por sustitución y una por inserción, escogiendo las secuencias de las proteínas PA, HA, NP, M1 y M2. La cepa de referencia será la utilizada en este trabajo A / duck / Hokkaido / Vac-1/2004, puesto que porta la estructura original y será la guía para encontrar las sustituciones y la inserción en las proteínas.

➤ Mutación por sustitución L672F en la PA

Cuando se alinearon las cincuenta y nueve secuencias de la PA, se encontró que cincuenta y ocho secuencias (98.30 %) de los aislamientos virales presentaron leucina en el sitio 672 (Figura 2), siendo de esta manera una mutación por sustitución como propia de la A / duck / Hokkaido / Vac-1/2004 tras los países y no es fundamental en el papel de la alta patogenicidad.

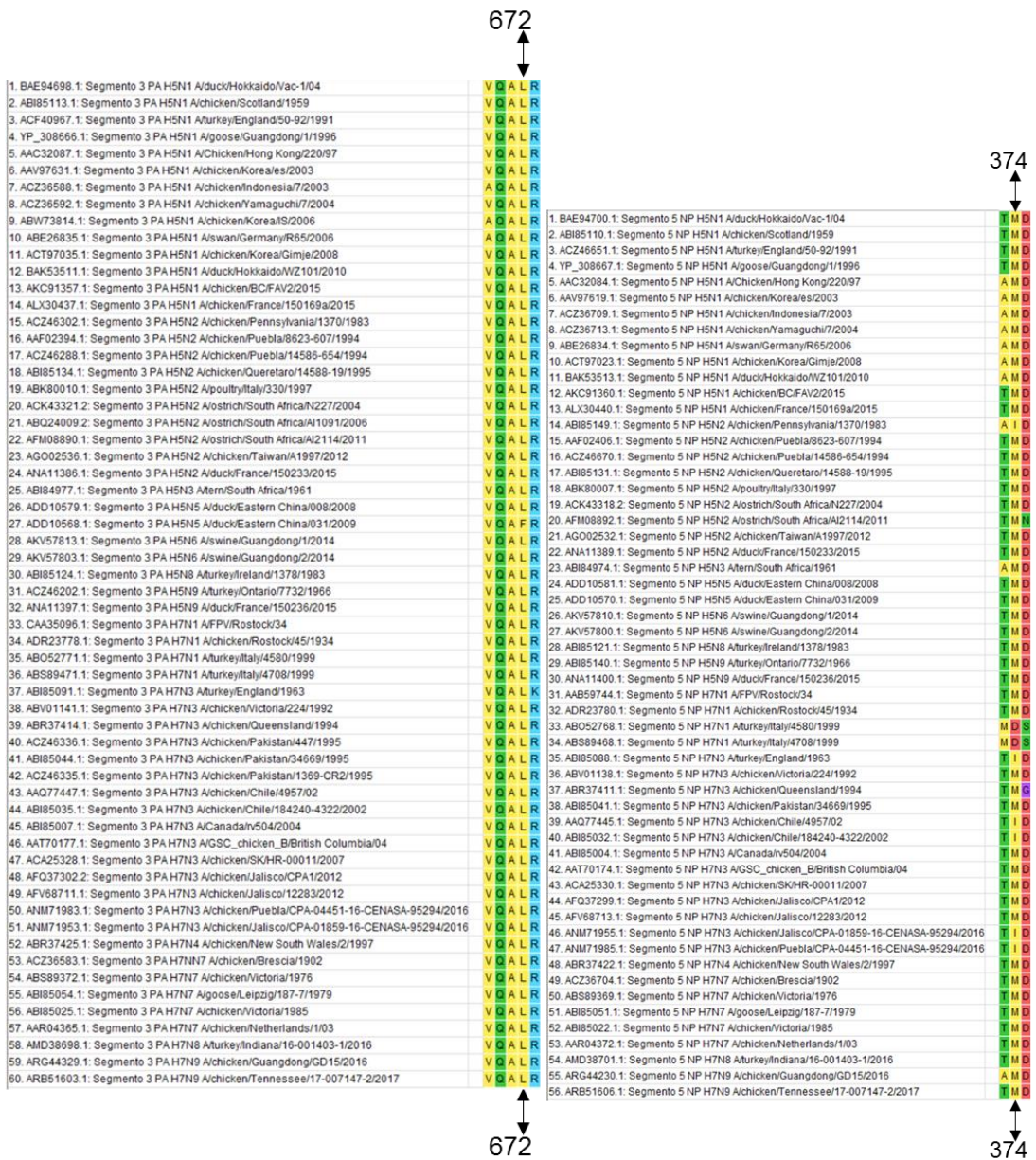


Figura 2: Alineamientos de las secuencias de aminoácidos de la Polimerasa Ácida en la posición 672 y de las secuencias de aminoácidos de la Nucleoproteína en el sitio 374 de los VIAAP asociados a una patogenicidad de tipo consenso. En la parte superior se observan la cepa de referencia A / duck / Hokkaido / Vac- 1/2004 (H5N1).

Análisis *in silico* de las mutaciones de alta patogenicidad descritas en los virus de influenza aviar Sergio David Rodríguez Toledano

➤ Mutaciones por sustitución H308Q y por inserción 338R en la HA

Debido a que no se menciona la numeración para los subtipos H7 solo se compararon las treinta secuencias de la HA del subtipo H5, donde ninguna de las proteínas (100%) presento glutamina en la posición 308 (Figura 3). Con esto se descarta su función en la alta patogenicidad.

Por otro lado no se puede incluir la mutación por inserción del aminoácido arginina en el sitio 338 por que cae dentro del punto de corte de la HA (Figura 3) y anteriormente ya se ha demostrado que la presencia de más de dos aminoácidos básicos en el mismo es determinante en la alta patogenicidad ^{2,17}, denotando a su vez que todas las secuencias alineadas tienen un sitio de escisión polibásico (Figura 3).

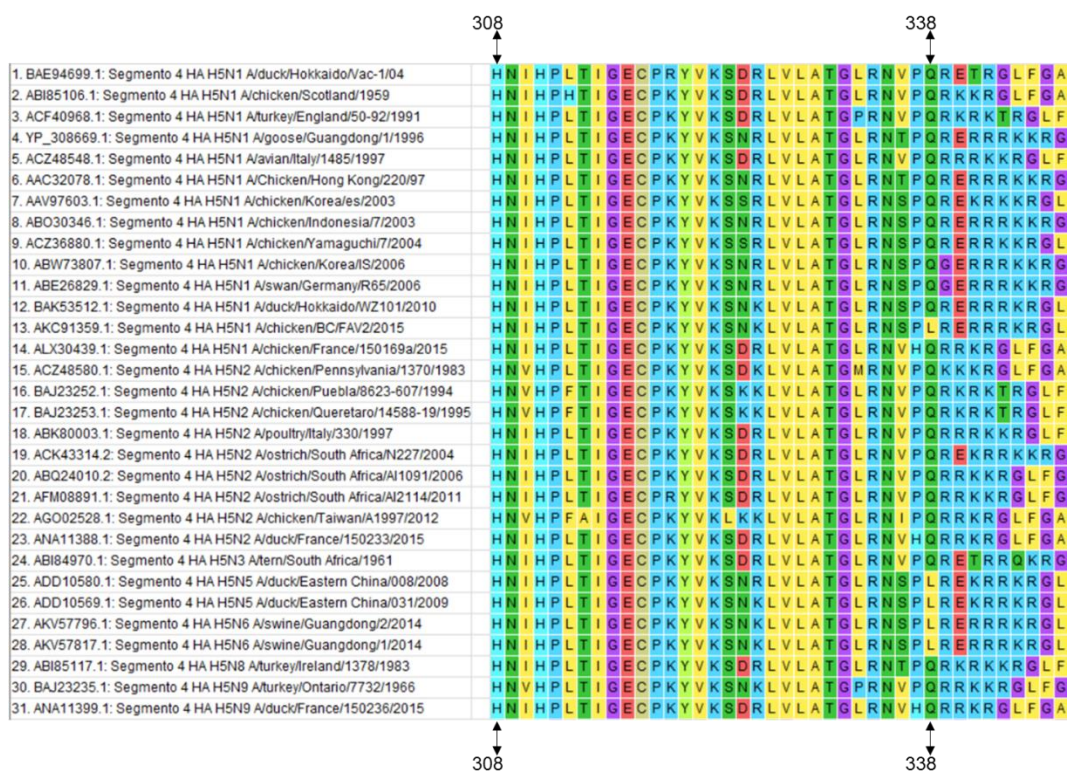


Figura 3: Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de la Hemoaglutinina en las posiciones 308 y 338 de los VIAAP asociados a una patogenicidad de tipo consenso. En la parte superior se observan la cepa de referencia A / duck / Hokkaido / Vac- 1/2004 (H5N1).

➤ Mutación por sustitución M374V en la NP

No hay secuencia que contenga valina de las cincuenta y cinco alineadas en la posición 374, la cepa enlistada en la posición 33 A/turkey/Italy/4580/1999 y 34 A/turkey/Italy/4708/1999 al tener la pérdida de un aminoácido en el sitio 17, permite la presencia del ácido aspártico y en la posición 373 de metionina. (Figura 2). Anulando la incidencia de este marcador de patogenicidad en los virus de alta patogenicidad.

➤ Mutaciones por sustitución D89N y R101K en la M1

De acuerdo al alineamiento de los 60 aislamientos virales, la presencia de 89N en la M1 es nula en todos, por el contrario conservan ácido aspártico en la posición 89 (Figura 4). Esta mutación por sustitución no podría explicar el incremento de la virulencia de otros virus altamente patógenos.

En el caso de la presencia de 101K en las 60 secuencias de proteínas, 39 de ellas carecen de lisina (65 %) y en su lugar presentan arginina en la posición 101 (Figura 4). Su repercusión en la alta patogenicidad no queda claro, por lo que se hará un análisis en conjunto englobando a las demás mutaciones que obtuvo Yamamoto N, et al. (2013) ⁴¹.

➤ Mutación por sustitución R45H en la M2

Cincuenta y cuatro de cincuenta y cinco aislamientos virales (98.18 %) carecen de histidina en la posición 45 (Figura 4) por lo que no es una mutación por sustitución conservada. Veits J. (2012) analizó varios aislamientos virales de alta patogenicidad y concluyó que hay VIAAP que presentan 44N y 45H⁴². Sin embargo, no se demostró experimentalmente que la mutación 44N esté asociada a la patogenicidad y en nuestro análisis se encontró que está presente en el 16.36 % (Figura 4).

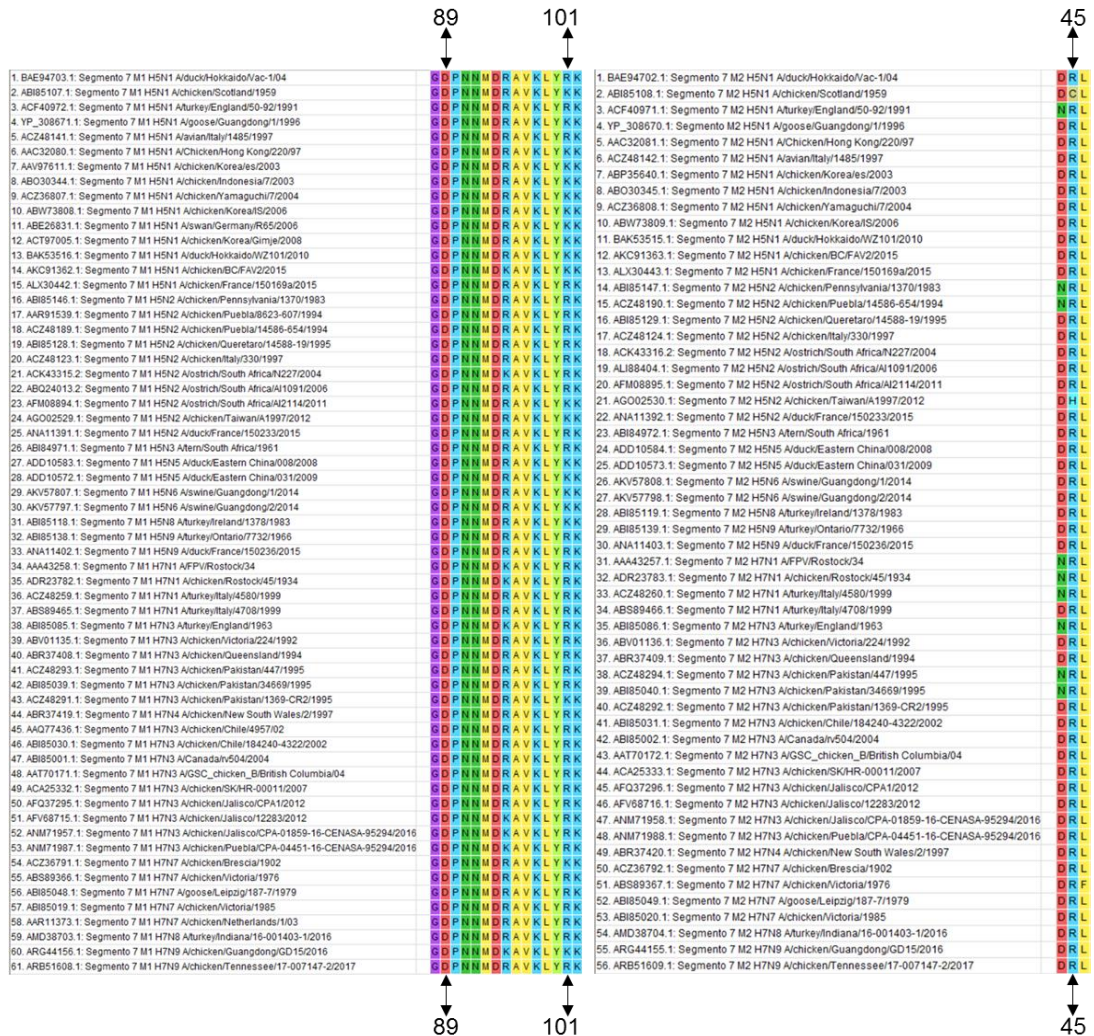


Figura 4: Alineamientos de las secuencias de aminoácidos de la proteína M1 en los sitios 89 y 101, y de las secuencias de aminoácidos de la proteína M2 en la posición 45 asociados a una patogenicidad de tipo consenso. En la parte superior se observan la cepa de referencia A / duck / Hokkaido / Vac- 1/2004 (H5N1).

El virus A/duck/Eastern China/031/2009 (H5N5) en la PA tiene L672F, el aislamiento A/chicken/Taiwan/A1997/2012 (H5N2) presentó en M1 la sustitución R101K y en M2 la R45H, lo que crea la duda de si este último aislamiento necesita de estas dos mutaciones junto con el sitio polibásico para su comportamiento de AP debido a que en el experimento la sustitución 45H fue indispensable para incrementar aún más la patogenicidad en comparación con las demás cambios moleculares anteriormente reportados ⁴¹.

VI.III.IV. Polimerasa Acida X (PA-X)

Hu J. et al. (2015) tenían el objetivo de demostrar que la expresión de la proteína PA-X atenua la virulencia de la cepa de AP A / Chicken / Jiangsu / k0402 / 2010 (H5N1) en modelos de ratón, pollo y pato, complementando de esa forma los hallazgos de Jagger B. et al.(2012)⁵. Mediante genética a la inversa crearon un virus a partir de A / Chicken / Jiangsu / k0402 / 2010 (CK10) resultando con r-CK10 y de este último otros dos con dos formas de mutaciones por sustitución en el gen PA: la primera forma se identificó como CK-PAX3 por presentar 3 mutaciones por sustitución en los nucleótidos T573C, C574A y T576A; la segunda forma se identificó como CK-PAX5 por tener 5 mutaciones por sustitución en los nucleótidos T568A, C569G, T573C, C574A y T576A. El virus CK10 mutante que porta cinco mutaciones por sustitución de nucleótidos en el gen PA mostró una expresión de PA-X 85 % respecto al 100% de r-CK10, al mismo tiempo el nivel de expresión de PA-X para el virus CK-PAX3 que albergaba tres mutaciones de nucleótidos en el gen de la AP, era el 47% del virus r-CK10. Al final las pruebas de virulencia mostraron que estos dos mutantes tenían mayor virulencia en ratones, pollos y ánades reales que su virus parental r-CK10. En conjunto, sus hallazgos sugirieron que la proteína PA-X actúa para disminuir la patogenicidad de H5N1 AIV en especies de aves al inhibir la replicación del virus y la respuesta del huésped y más importante aún, determinaron además que la pérdida de expresión de PA-X aumentaba la virulencia de CK10 tanto en pollos como en ánades reales y mejoraba la actividad de la polimerasa y la replicación del virus tanto *in vitro* como *in vivo* ⁴³. Se verificó la presencia de las PA-X de los virus VIAAP mediante la búsqueda en el GenBank, para conformar que la PA-X es

innecesaria en los aislados virales de AP por su propiedad de atenuación en los agentes causantes de influenza aviar.

La situación de PA-X es similar a la proteína PB1-F2, no hay secuencias completas de los virus y no se menciona en el GenBank que la proteína haya sido suprimida por alguna mutación, por lo que solo se dispone de 12 virus que presentan PA-X de las 60 cepas recabadas (20%) (Figura 5). Jagger B. (2012) y Hu J. (2015) utilizando subtipos H1N1 y H5N1 respectivamente evidenciaron experimentalmente que la ausencia de PA-X elevaba la patogenicidad de los virus en modelos de ratón y aves domésticas ^{5,43} pero esta mutación por supresión no fue esencial para incrementar de manera importante la patogenicidad de los virus, así que los virus de alta patogenicidad no dependen o no les afecta en gran medida su presencia o ausencia.

| | |
|---|---|
| 1. YP_006495800.1: Segmento 3 PA-X H5N1 A/goose/Guangdong/1/1996 | A L K N L E P M W M D S N R T A A L R A S F L K C R K K |
| 2. AKC91358.1: Segmento 3 PA-X H5N1 A/chicken/BC/FAV2/2015 | A L K T L E P M W M D S N R T A A L R A S F L K C Q K K |
| 3. ALX30438.1: Segmento 3 PA-X H5N1 A/chicken/France/150169a/2015 | A L K T L E P M W M D S N R T A A L R A S F L K C Q K K |
| 4. ALI88410.1: Segmento 3 PA-X H5N2 A/ostrich/South Africa/N227/2004 | A L K T L E P M W M D S N R T A A L R A S F L K C Q K K |
| 5. ALI88403.1: Segmento 3 PA-X H5N2 A/ostrich/South Africa/Al1091/2006 | A L K T L E S M W M D S S R T A A L R A S F L K C Q K K |
| 6. AGO02535.1: Segmento 3 PA-X H5N2 A/chicken/Taiwan/A1997/2012 | A L K T L E P M W M D S N R T A A L R A S F L R C Q K K |
| 7. ANA11387.1: Segmento 3 PA-X H5N2 A/duck/France/150233/2015 | A L K T L E P M W M D S N R T A A L R A S F L K C Q K K |
| 8. AKV57814.1: Segmento 3 PA-X H5N6 A/swine/Guangdong/1/2014 | A L K I L E P M W M D S N R T A A L R A S F L K C Q R K K |
| 9. AKV57804.1: Segmento 3 PA-X H5N6 A/swine/Guangdong/2/2014 | A L K I L E P M W M D L N R T A A L R A S F L K C Q R K K |
| 10. ANA11398.1: Segmento 3 PA-X H5N9 A/duck/France/150236/2015 | A L K T L E P M W M D S N R T A A L R A S F L R C Q K K |
| 11. AMD38699.1: Segmento 3 PA-X H7N8 A/turkey/Indiana/16-001403-1/2016 | A L K T L E P M W M D S N R T A A L R A S F L K C P K K |
| 12. ARB51604.1: Segmento 3 PA-X H7N9 A/chicken/Tennessee/17-007147-2/2017 | A L K T L E P M W M D S N R T A A L R A S F L K C P K K |

Figura 5: Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de la Polimerasa Ácida X de los VIAAP cuya presencia está asociada a la disminución de la patogenicidad en pollos y en ratones.

VI.III.V. Hemoaglutinina (HA)

En la búsqueda de las mutaciones en la HA, se destacó la variabilidad que hay entre los subtipos H5 y H7, debido a evidentes sustituciones, inserciones o eliminaciones de aminoácidos en sus proteínas. En cada análisis solo se seleccionó con las secuencias que fueran del mismo subtipo (con base a la HA) que trabajo cada autor, a menos que el autor haya mencionado la homología de la mutación en la Hemoaglutinina.

Webster RG, Kawaoka Y, et al. (1986) garantizaron que la mutación T13K en la HA de la cepa A / Chicken / Pennsylvania / 1/83 (H5N2) condujo a la pérdida de un patrón de N-glicosilación en la asparagina ubicada en la posición 11, resultando en una mejora en la capacidad de escisión de PCS por furina-proteasas, y al probarlo experimentalmente se obtuvo mortalidad del 100% en los pollos. Sugiriendo que la eliminación del carbohidrato por la ausencia del sitio de glicosilación en la posición 11 puede permitir el acceso de una enzima que reconoce las secuencias de aminoácidos básicas y da como resultado la activación de la escisión del HA en el virus virulento.²³ Se procedió a seleccionar las secuencias de la HA del subtipo H5, con el fin de corroborar si hay más cepas que perdieron este sitio de N-glicosilación en la posición 11 de la HA de todas las cepas del subtipo H5 de alta patogenicidad. Se tomó como referencia el aislamiento viral A/chicken/Pennsylvania/1370/1983 (H5N2) que tuvo una sustitución de Treonina por Lisina en la posición 13 de la HA.

Se observó que un aislamiento viral de veintinueve analizadas (3.44 %) perdió el sitio de N-glicosilación en la posición 11, la cual es A/chicken/Scotland/1959, ya que tuvo una sustitución de Asparagina por Lisina en esa misma posición. (Figura 6). No se puede estar seguro que esta mutación fue necesaria para aumentar su patogenicidad, puesto que no se cuenta con un aislamiento viral progenitor de baja patogenicidad, por lo que solo se puede basar a la evidencia experimental de Webster RG. y Kawaoka Y.²³

| | 11 | 13 |
|---|----|-----|
| 1. ACZ48580.1: Segmento 4 HA H5N2 A/chicken/Pennsylvania/1370/1983 | N | S K |
| 2. ABI85106.1: Segmento 4 HA H5N1 A/chicken/Scotland/1959 | K | S T |
| 3. ACF40968.1: Segmento 4 HA H5N1 A/turkey/England/50-92/1991 | N | S T |
| 4. YP_308669.1: Segmento 4 HA H5N1 A/goose/Guangdong/1/1996 | N | S T |
| 5. ACZ48548.1: Segmento 4 HA H5N1 A/avian/Italy/1485/1997 | N | S T |
| 6. AAC32078.1: Segmento 4 HA H5N1 A/Chicken/Hong Kong/220/97 | N | S T |
| 7. AAV97603.1: Segmento 4 HA H5N1 A/chicken/Korea/es/2003 | N | S T |
| 8. ABO30346.1: Segmento 4 HA H5N1 A/chicken/Indonesia/7/2003 | N | S T |
| 9. ACZ36880.1: Segmento 4 HA H5N1 A/chicken/Yamaguchi/7/2004 | N | S T |
| 10. ABW73807.1: Segmento 4 HA H5N1 A/chicken/Korea/IS/2006 | N | S T |
| 11. ABE26829.1: Segmento 4 HA H5N1 A/swan/Germany/R65/2006 | N | S T |
| 12. BAK53512.1: Segmento 4 HA H5N1 A/duck/Hokkaido/WZ101/2010 | N | S T |
| 13. AKC91359.1: Segmento 4 HA H5N1 A/chicken/BC/FAV2/2015 | N | S T |
| 14. ALX30439.1: Segmento 4 HA H5N1 A/chicken/France/150169a/2015 | N | S T |
| 15. BAJ23252.1: Segmento 4 HA H5N2 A/chicken/Puebla/8623-607/1994 | N | S T |
| 16. BAJ23253.1: Segmento 4 HA H5N2 A/chicken/Queretaro/14588-19/1995 | N | S T |
| 17. ABK80003.1: Segmento 4 HA H5N2 A/poultry/Italy/330/1997 | N | S T |
| 18. ACK43314.2: Segmento 4 HA H5N2 A/ostrich/South Africa/N227/2004 | N | S T |
| 19. ABQ24010.2: Segmento 4 HA H5N2 A/ostrich/South Africa/AI1091/2006 | N | S T |
| 20. AFM08891.1: Segmento 4 HA H5N2 A/ostrich/South Africa/AI2114/2011 | N | S T |
| 21. AGO02528.1: Segmento 4 HA H5N2 A/chicken/Taiwan/A1997/2012 | N | S T |
| 22. ANA11388.1: Segmento 4 HA H5N2 A/duck/France/150233/2015 | N | S T |
| 23. ABI84970.1: Segmento 4 HA H5N3 A/tern/South Africa/1961 | N | S T |
| 24. ADD10580.1: Segmento 4 HA H5N5 A/duck/Eastern China/008/2008 | N | S T |
| 25. ADD10569.1: Segmento 4 HA H5N5 A/duck/Eastern China/031/2009 | N | S T |
| 26. AKV57796.1: Segmento 4 HA H5N6 A/swine/Guangdong/2/2014 | N | S T |
| 27. AKV57817.1: Segmento 4 HA H5N6 A/swine/Guangdong/1/2014 | N | S T |
| 28. ABI85117.1: Segmento 4 HA H5N8 A/turkey/Ireland/1378/1983 | N | S T |
| 29. BAJ23235.1: Segmento 4 HA H5N9 A/turkey/Ontario/7732/1966 | N | S T |
| 30. ANA11399.1: Segmento 4 HA H5N9 A/duck/France/150236/2015 | N | S T |

Figura 6: Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de la HA de los subtipos H5 en el sitio 13 asociada al incremento de la patogenicidad. La posición 11 también pertenece a la estructura de un punto de N-glucosilación junto con el sitio 13. Las posiciones 11 y 13, se encontraron en las posiciones 27 y 29 respectivamente cuando se alinearon en el programa Mega v7. En la parte superior se encuentra la cepa de referencia A/chicken/Pennsylvania/1370/1983 (H5N2).

Perdue M.L. et al. (1995) experimentaron con el aislado de influenza aviar altamente patógeno A / Fowl / Victoria / 76 (H7N7), el cual contiene dos variantes de hemoaglutinina que se producen de manera natural y que difieren únicamente en la posesión de un sitio potencial de glicosilación unido a asparagina en la posición de aminoácido 188, que está cerca de la región de unión al receptor. Tomando como referencia que si 6 de 8 pollos de 4 semanas de vida mueren en un periodo de 10 días posterior a la inoculación (pi) con un virus de influenza se considerara como de alta patogenicidad, observaron que el virus con el sitio de glicosilación con una dosis letal media 50 (DLM₅₀) de 10⁵ daba como resultado la muerte de todos los pollos (8/8) en un tiempo de muerte promedio (TMP) de 2.3 días pi, en comparación con el virus que carecía del sitio de glicosilación donde utilizando la misma dosis se obtuvo la muerte de 2/8 pollos en un TMP de 3.5 días pi. Los resultados señalan que la diferencia en la letalidad se debe a la mutación por sustitución S188N adquiriendo de esa manera un sitio de N-glicosilación conformado por los aminoácidos NGS.⁴⁴ Esta evidencia fue necesaria aclararla en las secuencias de HA de los subtipos H7 para verificar la presencia de esta mutación por sustitución la cual genera un sitio de glicosilación y se relaciona con la virulencia de los virus, teniendo en cuenta la cepa A / Fowl / Victoria / 76 en su variante con 188N.

De las 26 secuencias que se compararon solo la cepa A/goose/Leipzig/187-7/1979 del subtipo H7N7 presento el sitio de N-glicosilación en la posición 188 (Figura 7) por lo que se complementara su análisis con base al tamaño del tallo de la NA más adelante.

| | 188 | 190 | | | |
|---|-----|-----|---|---|---|
| 31. CAA87393.1: Segmento 4 HA H7N7 A/Fowl/Victoria/76 | G | N | S | K | |
| 32. AAA43150.1: Segmento 4 HA H7N1 A/FPV/Rostock/34 | G | S | G | N | K |
| 33. ADR23779.1: Segmento 4 HA H7N1 A/chicken/Rostock/45/1934 | G | S | G | N | K |
| 34. ABO52764.1: Segmento 4 HA H7N1 A/turkey/Italy/4580/1999 | G | S | G | N | K |
| 35. ABS89464.1: Segmento 4 HA H7N1 A/turkey/Italy/4708/1999 | G | S | G | N | K |
| 36. ABI85084.1: Segmento 4 HA H7N3 A/turkey/England/1963 | G | S | G | N | K |
| 37. ABV01134.1: Segmento 4 HA H7N3 A/chicken/Victoria/224/1992 | G | S | G | N | K |
| 38. ABR37407.1: Segmento 4 HA H7N3 A/chicken/Queensland/1994 | G | S | G | S | K |
| 39. AAG10650.2: Segmento 4 HA H7N3 A/chicken/Pakistan/447/1995 | G | S | G | N | K |
| 40. ABI85038.1: Segmento 4 HA H7N3 A/chicken/Pakistan/34669/1995 | G | S | G | N | K |
| 41. AAQ77404.1: Segmento 4 HA H7N3 A/chicken/Chile/4957/02 | G | S | G | A | K |
| 42. ABI85029.1: Segmento 4 HA H7N3 A/chicken/Chile/184240-4322/2002 | G | S | G | A | K |
| 43. AAT70170.1: Segmento 4 HA H7N3 A/GSC_chicken_B/British Columbia/04 | G | S | G | N | K |
| 44. ABI85000.1: Segmento 4 HA H7N3 A/Canada/rv504/2004 | G | S | G | N | K |
| 45. ACA25329.1: Segmento 4 HA H7N3 A/chicken/SK/HR-00011/2007 | G | S | G | N | K |
| 46. AFN85519.1: Segmento 4 HA H7N3 A/chicken/Jalisco/CPA1/2012 | G | S | G | N | K |
| 47. AFB68712.1: Segmento 4 HA H7N3 A/chicken/Jalisco/12283/2012 | G | S | G | N | K |
| 48. ANM71984.1: Segmento 4 HA H7N3 A/chicken/Puebla/CPA-04451-16-CENASA-95294/2016 | G | S | G | D | K |
| 49. ANM71954.1: Segmento 4 HA H7N3 A/chicken/Jalisco/CPA-01859-16-CENASA-95294/2016 | G | S | G | D | K |
| 50. ABR37418.1: Segmento 4 HA H7N4 A/chicken/New South Wales/2/1997 | G | S | G | S | K |
| 51. ACZ36872.1: Segmento 4 HA H7N7 A/chicken/Brescia/1902 | G | S | G | N | K |
| 52. ABS89365.1: Segmento 4 HA H7N7 A/chicken/Victoria/1976 | G | S | G | S | K |
| 53. AAA92245.1: Segmento 4 HA H7N7 A/goose/Leipzig/187-7/1979 | G | N | G | S | K |
| 54. AAR02639.2: Segmento 4 HA H7N7 A/chicken/Netherlands/1/03 | G | S | G | N | K |
| 55. AMD38700.1: Segmento 4 HA H7N8 A/turkey/Indiana/16-001403-1/2016 | G | S | G | N | K |
| 56. ARG44098.1: Segmento 4 HA H7N9 A/chicken/Guangdong/GD15/2016 | G | S | G | N | K |
| 57. ARB51605.1: Segmento 4 HA H7N9 A/chicken/Tennessee/17-007147-2/2017 | G | S | G | N | K |

Figura 7: Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de la HA de los subtipos H7 en el sitio 188 asociada al aumento de la patogenicidad. La posición 188 también pertenece a la estructura de un punto de N-glicosilación junto con el sitio 190. Las posiciones 188 y 190, se encontraron en las posiciones 206 y 208 respectivamente cuando se alinearon en el programa Mega v7. En la parte superior se encuentra la cepa de referencia A / Fowl / Victoria / 76 (H7N7).

Baigent S.J. et al. (2001) utilizando la cepa A / FPV / Rostock / 34 del subtipo H7N1 que tiene glicanos en Asn133 y Asn158 (123 y 149 en numeración H7), estando Asn 158 en la región carboxilo terminal del HA y Asn 133 en las proximidades del RBS. En uno de los experimentos con mutantes de Rostock se observó que al carecer de uno o ambos glicanos, estos dos sitios de glicosilación en la estructura de la cabeza globular de HA reducen la afinidad de HA por la unión al receptor y hacen que el virus sea menos dependiente de la función NA y a su vez menos sensibles a los fármacos inhibidores de NA. En comparación el oligosacárido unido a Asn149 desempeña un papel dominante en el control de la propagación del virus, mientras que el unido a Asn123 es menos eficaz. Destacando que la HA con glicosilación en la posición 158 da un

Análisis *in silico* de las mutaciones de alta patogenicidad descritas en los virus de influenza aviar

crecimiento eficiente cuando se combina con NA de tallo corto, cuando se combina con NA de tallo largo, el crecimiento es muy eficiente y el exceso de actividad de NA es una desventaja, pero un HA que carece de glicosilación en la posición 158 combinada con NA de tallo largo pueden representar combinaciones óptimas ⁴⁵. Resultados similares fueron descritos también por Wagner (2000) ⁴⁶ y Ohuchi (1997) ⁴⁷. En nuestro estudio, se ejecutó el análisis de todas las secuencias de la proteína del segmento 4 de cepas del subtipo H7, para corroborar si presentan dichos sitios en la HA, verificando a la vez el tamaño de su respectivo tallo de la NA, comprobando si hay correlación directa al comportamiento de los virus. La cepa A / FPV / Rostock / 34 (H7N1) se usó de referencia, debido a que se demostraron en ella los dos sitios de glicosilación y un tallo corto de la NA.

➤ N-Glicosilación 123 y 149

Diecisiete de veinticinco virus (68 %) del subtipo H7 no tienen el sitio de glicosilación en la posición 123 y veintitrés de los mismos veinticinco (92 %) no portan el sitio de N-glicosilación en la posición 149 (Figura 8).

Haciendo otro análisis con base al tallo de la Neuraminidasa (para confirmar el equilibrio entre la HA y la NA) de los aislados virales que contienen los sitios de glicosilación y que fueron: A/chicken/Rostock/45/1934_A/turkey/Italy/4580/1999_A/turkey/Italy/4708/1999_A/turkey/England/1963_A/chicken/Pakistan/34669/1995_A/chicken/Brescia/1902_A/chicken/Puebla/CPA-04451-16-CENASA-95294/2016 y A/chicken/Jalisco/CPA-01859-16-CENASA-95294/2016 (estas dos últimas presentan los dos sitios de glicosilación).

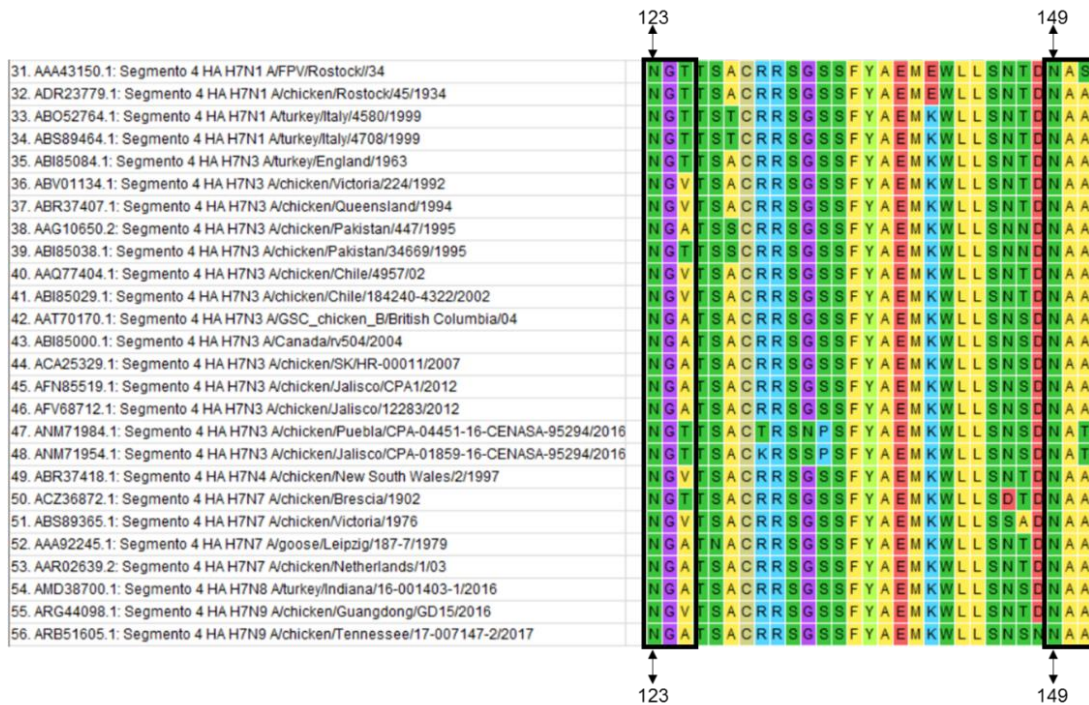


Figura 8: Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de la Hemoaglutinina de los subtipos H7 en el sitio 123 y 149, y cuyos puntos de N-glicosilación están asociados al incremento de la patogenicidad. Las posiciones 123 y 149 se encontraron en las posiciones 141 y 167 respectivamente cuando se alinearon en el programa Mega v7. En la parte superior se localiza la cepa de referencia A / FPV / Rostock / 34 (H7N1).

Solo las cepas *A/chicken/Puebla/CPA-04451-16-CENASA-95294/2016* (H7N3), *A/chicken/Jalisco/CPA-01859-16-CENASA-95294/2016* (H7N3) y *A/chicken/Brescia/1902* (H7N7) a pesar de poseer los sitios de N-glicosilación no presentan a su vez un tallo corto de la Neuraminidasa, ya que el número de aminoácidos de la proteína está completo. (Figura 9) Estos resultados contradicen lo mencionado por Baigent S.J. (2001), pero sugiere que los sitios de glicosilación tienen relación con el tipo de Neuraminidasa, ya que los subtipos H7N1 cumplen con la regla por lo que será analizado más adelante.⁴⁸

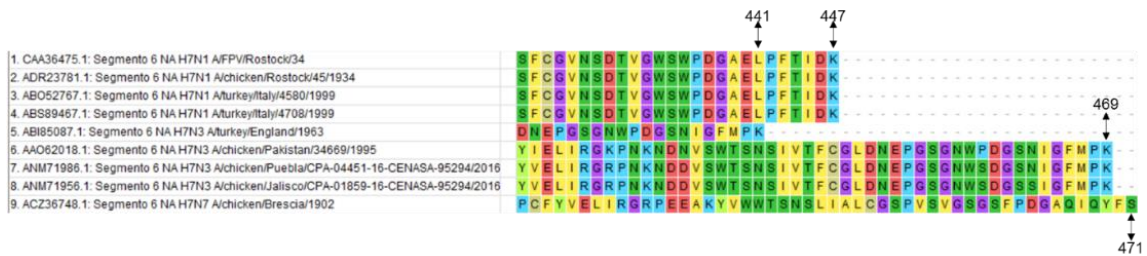


Figura 9: Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de la Neuraminidasa en la región del extremo terminal de los VIAAP que a su vez presentaron los sitios de N-glicosilación 123 y 149, y que cuya presencia asociados al aumento de la virulencia. En la parte superior se encuentra la cepa de referencia A / FPV / Rostock / 34 (H7N1). Los sitios de N-glicosilación de la cepa de referencia están en la posición 141 con la secuencia NGT y 167 con la secuencia NAS, en vez de los sitios 123 y 149.

Gohrbandt S, et al (2011) estipularon que la mayoría de los VIAAP H5 tienen serina o treonina en la posición 346 en su HA (correspondiente a la posición 323 según la numeración H3), utilizando la cepa de AP A/Swan/Germany/R65/06 (H5N1), tras el cambio de serina por valina (R65-V) condujo a una supervivencia prolongada en menor grado en comparación con los animales infectados con R65. Ambos virus seguían siendo altamente patógenos, ya que no había diferencias significativas en la diseminación del virus o tropismo de órganos. En general, sus observaciones sugirieron que la serina 346 en R65 HA podría contribuir a la virulencia en el pollo.⁴⁹ Por lo cual se llevó a cabo la selección de secuencias de la Hemoaglutinina del subtipo H5, para verificar la importancia de la serina o treonina en la posición 346, usando como referencia la cepa A/Swan/Germany/R65/06, puesto que en la posición 346 tiene Serina.

➤ Mutación por sustitución V446S/T

Dieciséis de veintinueve cepas (55.17 %) no portan serina o treonina en la posición 446 (Figura 10). En el artículo menciona que de no portar estos aminoácidos, la función del virus es menos virulenta, pero no elimina por completo la patogenicidad.⁴⁹

| | 346 |
|---|---------------------------|
| 1. ABE26829.1: Segmento 4 HA H5N1 A/swan/Germany/R65/2006 | S P Q G E R R R K K R G |
| 2. ABI85106.1: Segmento 4 HA H5N1 A/chicken/Scotland/1959 | V P Q R K K R G L F G A |
| 3. ACF40968.1: Segmento 4 HA H5N1 A/turkey/England/50-92/1991 | V P Q R K R K T R G L F |
| 4. YP_308669.1: Segmento 4 HA H5N1 A/goose/Guangdong/1/1996 | T P Q R E R R R K K R G |
| 5. ACZ48548.1: Segmento 4 HA H5N1 A/avian/Italy/1485/1997 | V P Q R R R K K R G L F |
| 6. AAC32078.1: Segmento 4 HA H5N1 A/Chicken/Hong Kong/220/97 | T P Q R E R R R K K R G |
| 7. AAV97603.1: Segmento 4 HA H5N1 A/chicken/Korea/es/2003 | S P Q R E K R K K R G L |
| 8. ABO30346.1: Segmento 4 HA H5N1 A/chicken/Indonesia/7/2003 | S P Q R E R R R K K R G |
| 9. ACZ36880.1: Segmento 4 HA H5N1 A/chicken/Yamaguchi/7/2004 | S P Q R E R R R K K R G L |
| 10. ABW73807.1: Segmento 4 HA H5N1 A/chicken/Korea/IS/2006 | S P Q G E R R R K K R G |
| 11. BAK53512.1: Segmento 4 HA H5N1 A/duck/Hokkaido/WZ101/2010 | S P Q R E R R R K R G L |
| 12. AKC91359.1: Segmento 4 HA H5N1 A/chicken/BC/FAV2/2015 | S P L R E R R R K R G L |
| 13. ALX30439.1: Segmento 4 HA H5N1 A/chicken/France/150169a/2015 | V H Q R R K R G L F G A |
| 14. ACZ48580.1: Segmento 4 HA H5N2 A/chicken/Pennsylvania/1370/1983 | V P Q K K K R G L F G A |
| 15. BAJ23252.1: Segmento 4 HA H5N2 A/chicken/Puebla/8623-607/1994 | V P Q R K R K T R G L F |
| 16. BAJ23253.1: Segmento 4 HA H5N2 A/chicken/Queretaro/14588-19/1995 | V P Q R K R K T R G L F |
| 17. ABK80003.1: Segmento 4 HA H5N2 A/poultry/Italy/330/1997 | V P Q R R R K K R G L F |
| 18. ACK43314.2: Segmento 4 HA H5N2 A/ostrich/South Africa/N227/2004 | V P Q R E K R R K K R G |
| 19. ABQ24010.2: Segmento 4 HA H5N2 A/ostrich/South Africa/AI1091/2006 | V P Q R R K K R G L F G |
| 20. AFM08891.1: Segmento 4 HA H5N2 A/ostrich/South Africa/AI2114/2011 | V P Q R R K K R G L F G |
| 21. AGO02528.1: Segmento 4 HA H5N2 A/chicken/Taiwan/A1997/2012 | I P Q R R K R G L F G A |
| 22. ANA11388.1: Segmento 4 HA H5N2 A/duck/France/150233/2015 | V H Q R R K R G L F G A |
| 23. ABI84970.1: Segmento 4 HA H5N3 A/tern/South Africa/1961 | V P Q R E T R R Q K R G |
| 24. ADD10580.1: Segmento 4 HA H5N5 A/duck/Eastern China/008/2008 | S P L R E K R R K R G L |
| 25. ADD10569.1: Segmento 4 HA H5N5 A/duck/Eastern China/031/2009 | S P L R E K R R K R G L |
| 26. AKV57796.1: Segmento 4 HA H5N6 A/swine/Guangdong/2/2014 | S P L R E R R R K R G L |
| 27. AKV57817.1: Segmento 4 HA H5N6 A/swine/Guangdong/1/2014 | S P L R E R R R K R G L |
| 28. ABI85117.1: Segmento 4 HA H5N8 A/turkey/Ireland/1378/1983 | T P Q R K R K K R G L F |
| 29. BAJ23235.1: Segmento 4 HA H5N9 A/turkey/Ontario/7732/1966 | V P Q R R K K R G L F G |
| 30. ANA11399.1: Segmento 4 HA H5N9 A/duck/France/150236/2015 | V H Q R R K R G L F G A |
| | 346 |

Figura 10: Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de la Hemoaglutinina de los subtipos H5 en la posición 346 relacionada al incremento de la patogenicidad. En la parte superior se localiza la cepa de referencia A/Swan/Germany/R65/06 (H5N1). El sitio 346 se encontró en la posición 336 cuando al alinear las secuencias en el Mega v7.

Maruyama J. (2013) identificaron seis sustituciones de aminoácidos por comparación de las secuencias genómicas entre la cepa A / duck / Hokkaido / Vac-2/2004 (H7N7) y la misma después de tres pases en embrión de pollo: Lys123Glu en PB2, Asn16Asp en PB1, Glu227Gly e Ile388Thr en HA, Gly228Arg en M1 y Leu46Pro en M2. Murieron todos los pollos (8/8) inoculados con Vac2sub-P3 por vía intravenosa, resultando con IPIV de 2.21. Por consiguiente probaron las mutaciones de manera individual, demostrando que la presencia en Vac2sub-P3 de 227Glu y 388Ile en HA de forma individual provocan la supervivencia de los pollos.⁵⁰ Se llevó a cabo la búsqueda de estas dos mutaciones esenciales en la HA, seleccionando los subtipos H7 y la cepa de referencia sin mutaciones A / duck / Hokkaido / Vac-2/2004 (H7N7).

➤ Mutaciones por sustitución E227G e I388T en la HA

Las 26 secuencias (100%) presentaron el aminoácido glicina en vez de ácido glutámico en la posición 227, y en la posición 388 todas las secuencias portan treonina (Figura 11). Estos resultados muestran que todas los aislamientos virales de VIAAP del subtipo H7 analizados conservan estas dos mutaciones en la HA.

| | 227 | 388 |
|---|-----|-----|
| 31. BAE53684.1: Segmento 4 HA H7N7 A/duck/Hokkaido/Vac-2/04 | E | I |
| 32. AAA43150.1: Segmento 4 HA H7N1 A/FPV/Rostock/34 | G | T |
| 33. ADR23779.1: Segmento 4 HA H7N1 A/chicken/Rostock/45/1934 | G | T |
| 34. ABO52764.1: Segmento 4 HA H7N1 A/turkey/Italy/4580/1999 | G | T |
| 35. ABS89464.1: Segmento 4 HA H7N1 A/turkey/Italy/4708/1999 | G | T |
| 36. ABI85084.1: Segmento 4 HA H7N3 A/turkey/England/1963 | G | T |
| 37. ABV01134.1: Segmento 4 HA H7N3 A/chicken/Victoria/224/1992 | G | T |
| 38. ABR37407.1: Segmento 4 HA H7N3 A/chicken/Queensland/1994 | G | T |
| 39. AAG10650.2: Segmento 4 HA H7N3 A/chicken/Pakistan/447/1995 | G | T |
| 40. ABI85038.1: Segmento 4 HA H7N3 A/chicken/Pakistan/34669/1995 | G | T |
| 41. AAQ77404.1: Segmento 4 HA H7N3 A/chicken/Chile/4957/02 | G | T |
| 42. ABI85029.1: Segmento 4 HA H7N3 A/chicken/Chile/184240-4322/2002 | G | T |
| 43. AAT70170.1: Segmento 4 HA H7N3 A/GSC_chicken_B/British Columbia/04 | G | T |
| 44. ABI85000.1: Segmento 4 HA H7N3 A/Canada/rv504/2004 | G | T |
| 45. ACA25329.1: Segmento 4 HA H7N3 A/chicken/SK/HR-00011/2007 | G | T |
| 46. AFN85519.1: Segmento 4 HA H7N3 A/chicken/Jalisco/CPA1/2012 | G | T |
| 47. AFB68712.1: Segmento 4 HA H7N3 A/chicken/Jalisco/12283/2012 | G | T |
| 48. ANM71984.1: Segmento 4 HA H7N3 A/chicken/Puebla/CPA-04451-16-CENASA-95294/2016 | G | T |
| 49. ANM71954.1: Segmento 4 HA H7N3 A/chicken/Jalisco/CPA-01859-16-CENASA-95294/2016 | G | T |
| 50. ABR37418.1: Segmento 4 HA H7N4 A/chicken/New South Wales/2/1997 | G | T |
| 51. ACZ36872.1: Segmento 4 HA H7N7 A/chicken/Brescia/1902 | G | T |
| 52. ABS89365.1: Segmento 4 HA H7N7 A/chicken/Victoria/1976 | G | T |
| 53. AAA92245.1: Segmento 4 HA H7N7 A/goose/Leipzig/187-7/1979 | G | T |
| 54. AAR02639.2: Segmento 4 HA H7N7 A/chicken/Netherlands/1/03 | G | T |
| 55. AMD38700.1: Segmento 4 HA H7N8 A/turkey/Indiana/16-001403-1/2016 | G | T |
| 56. ARG44098.1: Segmento 4 HA H7N9 A/chicken/Guangdong/GD15/2016 | G | T |
| 57. ARB51605.1: Segmento 4 HA H7N9 A/chicken/Tennessee/17-007147-2/2017 | G | T |

Figura 11: Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de la HA de los subtipos H7 en los sitios 227 y 388 asociados a una patogenicidad de tipo consenso. En la parte superior se encuentra la cepa de referencia A / duck / Hokkaido / Vac-2/2004 (H7N7).

Las demás mutaciones por sustitución presentes en el artículo se analizaron en un segundo plano de forma conjunta, ya que su comportamiento fue sinérgico provocando un IPIV de 2.21 con la ayuda de un sitio de escisión polibásico.⁵⁰

➤ Mutación por sustitución K123E en la PB2

Curiosamente solo la cepa A/turkey/Ireland/1378/1983 (H5N8) fue la única de las cincuenta y un cepas (1.96 %) que no contiene ácido glutámico en el sitio 123 en la proteína PB2 (Figura 12).

➤ Mutación por sustitución L46P en la M2

La presencia de 46P fue nula en las cincuenta y cinco secuencias alineadas de M2. (Figura 13)

| Secuencia | 228 | 46 |
|---|-------|----|
| 1. BAE53688.1: Segmento 7 M1 H7N7 A/duck/Hokkaido/Vac-2/04 | A G L | |
| 2. ABI85107.1: Segmento 7 M1 H5N1 A/chicken/Scotland/1959 | A G L | |
| 3. ACF40972.1: Segmento 7 M1 H5N1 A/turkey/England/50-92/1991 | A G L | |
| 4. YP_308670.1: Segmento 7 M1 H5N1 A/goose/Guangdong/1/1996 | A G L | |
| 5. AC248141.1: Segmento 7 M1 H5N1 A/swan/Italy/1485/1997 | A G L | |
| 6. AAC32080.1: Segmento 7 M1 H5N1 A/chicken/Hong Kong/220/97 | A G L | |
| 7. AAV97811.1: Segmento 7 M1 H5N1 A/chicken/Korea/S/2003 | A G L | |
| 8. ABO30344.1: Segmento 7 M1 H5N1 A/chicken/Indonesia/7/2003 | A G L | |
| 9. AC236807.1: Segmento 7 M1 H5N1 A/chicken/Yamaguchi/7/2004 | A G L | |
| 10. ABV73808.1: Segmento 7 M1 H5N1 A/chicken/Korea/S/2006 | A G L | |
| 11. ABE26831.1: Segmento 7 M1 H5N1 A/swan/Germany/R65/2006 | A G L | |
| 12. ACT97005.1: Segmento 7 M1 H5N1 A/chicken/Korea/Gimje/2008 | A G L | |
| 13. BAK53516.1: Segmento 7 M1 H5N1 A/duck/Hokkaido/WZ101/2010 | A G L | |
| 14. AKC91362.1: Segmento 7 M1 H5N1 A/chicken/BC/FAV2/2015 | A G L | |
| 15. ALX30442.1: Segmento 7 M1 H5N1 A/chicken/France/150169a/2015 | A G L | |
| 16. ABI85146.1: Segmento 7 M1 H5N2 A/chicken/Pennsylvania/1370/1983 | A G L | |
| 17. AAR91539.1: Segmento 7 M1 H5N2 A/chicken/Puebla/8623-607/1994 | A G L | |
| 18. AC248189.1: Segmento 7 M1 H5N2 A/chicken/Puebla/14586-654/1994 | A G L | |
| 19. ABI85128.1: Segmento 7 M1 H5N2 A/chicken/Queretaro/14588-19/1995 | A G L | |
| 20. ACZ48123.1: Segmento 7 M1 H5N2 A/chicken/Italy/330/1997 | A G L | |
| 21. ACK43315.2: Segmento 7 M1 H5N2 A/ostrich/South Africa/N227/2004 | A G L | |
| 22. ABQ24013.2: Segmento 7 M1 H5N2 A/ostrich/South Africa/AI1091/2006 | A G L | |
| 23. AFM08894.1: Segmento 7 M1 H5N2 A/ostrich/South Africa/AI2114/2011 | A G L | |
| 24. AGO02529.1: Segmento 7 M1 H5N2 A/chicken/Taiwan/A1997/2012 | A G L | |
| 25. ANA11391.1: Segmento 7 M1 H5N2 A/duck/France/150233/2015 | A G L | |
| 26. ABIB4971.1: Segmento 7 M1 H5N3 A/tern/South Africa/1961 | A G L | |
| 27. ADD10583.1: Segmento 7 M1 H5N5 A/duck/Eastern China/008/2008 | A G L | |
| 28. ADD10572.1: Segmento 7 M1 H5N5 A/duck/Eastern China/031/2009 | A G L | |
| 29. AKV57807.1: Segmento 7 M1 H5N6 A/swine/Guangdong/1/2014 | A G L | |
| 30. AKV57797.1: Segmento 7 M1 H5N6 A/swine/Guangdong/2/2014 | A G L | |
| 31. ABI85118.1: Segmento 7 M1 H5N8 A/turkey/Ireland/1378/1983 | A G L | |
| 32. ABI85138.1: Segmento 7 M1 H5N9 A/turkey/Ontario/7732/1966 | A G L | |
| 33. ANA11402.1: Segmento 7 M1 H5N9 A/duck/France/150236/2015 | A G L | |
| 34. AAA43258.1: Segmento 7 M1 H7N1 A/FPV/Rostock/34 | A G L | |
| 35. ADR23782.1: Segmento 7 M1 H7N1 A/chicken/Rostock/45/1934 | A G L | |
| 36. ACZ48259.1: Segmento 7 M1 H7N1 A/turkey/Italy/4580/1999 | A G L | |
| 37. ABS89465.1: Segmento 7 M1 H7N1 A/turkey/Italy/4708/1999 | A G L | |
| 38. ABI85085.1: Segmento 7 M1 H7N3 A/turkey/England/1963 | A G L | |
| 39. ABV01135.1: Segmento 7 M1 H7N3 A/chicken/Victoria/224/1992 | A G L | |
| 40. ABR37408.1: Segmento 7 M1 H7N3 A/chicken/Queenland/1994 | A G L | |
| 41. ACZ48293.1: Segmento 7 M1 H7N3 A/chicken/Pakistan/447/1995 | A G L | |
| 42. ABI85039.1: Segmento 7 M1 H7N3 A/chicken/Pakistan/34669/1995 | A G L | |
| 43. ACZ48291.1: Segmento 7 M1 H7N3 A/chicken/Pakistan/1369-CR2/1995 | A G L | |
| 44. ABR37419.1: Segmento 7 M1 H7N4 A/chicken/New South Wales/2/1997 | A G L | |
| 45. AAQ77436.1: Segmento 7 M1 H7N3 A/chicken/Chile/4957/02 | A G L | |
| 46. ABI85030.1: Segmento 7 M1 H7N3 A/chicken/Chile/184240-4322/2002 | A G L | |
| 47. ABI85001.1: Segmento 7 M1 H7N3 A/Canada/504/2004 | A G L | |
| 48. AAT70171.1: Segmento 7 M1 H7N3 A/GSC_chicken_B/British Columbia/04 | A G L | |
| 49. ACA25332.1: Segmento 7 M1 H7N3 A/chicken/SK/HR-00011/2007 | A G L | |
| 50. AFQ37295.1: Segmento 7 M1 H7N3 A/chicken/Jalisco/CPA1/2012 | A G L | |
| 51. AFV68715.1: Segmento 7 M1 H7N3 A/chicken/Jalisco/12283/2012 | A G L | |
| 52. ANM71957.1: Segmento 7 M1 H7N3 A/chicken/Jalisco/CPA-01859-16-CENASA-95294/2016 | A G L | |
| 53. ANM71987.1: Segmento 7 M1 H7N3 A/chicken/Puebla/CPA-04451-16-CENASA-95294/2016 | A G L | |
| 54. ACZ36791.1: Segmento 7 M1 H7N7 A/chicken/Brescia/1902 | A G L | |
| 55. ABS89366.1: Segmento 7 M1 H7N7 A/chicken/Victoria/1976 | A G L | |
| 56. ABI85048.1: Segmento 7 M1 H7N7 A/goose/Leipzig/187-7/1979 | A G L | |
| 57. ABI85019.1: Segmento 7 M1 H7N7 A/chicken/Victoria/1985 | A G L | |
| 58. AAR11373.1: Segmento 7 M1 H7N7 A/chicken/Netherlands/1/03 | A G L | |
| 59. AMD38703.1: Segmento 7 M1 H7N8 A/turkey/Indiana/16-001403-1/2016 | A G L | |
| 60. ARG44156.1: Segmento 7 M1 H7N9 A/chicken/Guangdong/GD15/2016 | A G L | |
| 61. ARB51608.1: Segmento 7 M1 H7N9 A/chicken/Tennessee/17-007147-2/2017 | A G L | |
| 1. BAE53687.2: Segmento 7 M2 H7N7 A/duck/Hokkaido/Vac-2/04 | R L F | |
| 2. ABI85108.1: Segmento 7 M2 H5N1 A/chicken/Scotland/1959 | C L F | |
| 3. ACF40971.1: Segmento 7 M2 H5N1 A/turkey/England/50-92/1991 | R L F | |
| 4. YP_308670.1: Segmento 7 M2 H5N1 A/goose/Guangdong/1/1996 | R L F | |
| 5. AAC32081.1: Segmento 7 M2 H5N1 A/chicken/Hong Kong/220/97 | R L F | |
| 6. ACZ48142.1: Segmento 7 M2 H5N1 A/avian/Italy/1485/1997 | R L F | |
| 7. ABP35640.1: Segmento 7 M2 H5N1 A/chicken/Korea/S/2003 | R L F | |
| 8. ABO30345.1: Segmento 7 M2 H5N1 A/chicken/Indonesia/7/2003 | R L F | |
| 9. ACZ36808.1: Segmento 7 M2 H5N1 A/chicken/Yamaguchi/7/2004 | R L F | |
| 10. ABW73809.1: Segmento 7 M2 H5N1 A/chicken/Korea/S/2006 | R L F | |
| 11. BAK53515.1: Segmento 7 M2 H5N1 A/duck/Hokkaido/WZ101/2010 | R L F | |
| 12. AKC91363.1: Segmento 7 M2 H5N1 A/chicken/BC/FAV2/2015 | R L F | |
| 13. ALX30443.1: Segmento 7 M2 H5N1 A/chicken/France/150169a/2015 | R L F | |
| 14. ABI85147.1: Segmento 7 M2 H5N2 A/chicken/Pennsylvania/1370/1983 | R L F | |
| 15. ACZ48190.1: Segmento 7 M2 H5N2 A/chicken/Puebla/14586-654/1994 | R L F | |
| 16. ABI85129.1: Segmento 7 M2 H5N2 A/chicken/Queretaro/14588-19/1995 | R L F | |
| 17. ACZ48124.1: Segmento 7 M2 H5N2 A/chicken/Italy/330/1997 | R L F | |
| 18. ACK43316.2: Segmento 7 M2 H5N2 A/ostrich/South Africa/N227/2004 | R L F | |
| 19. ALI88404.1: Segmento 7 M2 H5N2 A/ostrich/South Africa/AI1091/2006 | R L F | |
| 20. AFM08895.1: Segmento 7 M2 H5N2 A/ostrich/South Africa/AI2114/2011 | R L F | |
| 21. AGO02530.1: Segmento 7 M2 H5N2 A/chicken/Taiwan/A1997/2012 | H L F | |
| 22. ANA11392.1: Segmento 7 M2 H5N2 A/duck/France/150233/2015 | R L F | |
| 23. ABI84972.1: Segmento 7 M2 H5N3 A/tern/South Africa/1961 | R L F | |
| 24. ADD10584.1: Segmento 7 M2 H5N5 A/duck/Eastern China/008/2008 | R L F | |
| 25. ADD10573.1: Segmento 7 M2 H5N5 A/duck/Eastern China/031/2009 | R L F | |
| 26. AKV57808.1: Segmento 7 M2 H5N6 A/swine/Guangdong/1/2014 | R L F | |
| 27. AKV57798.1: Segmento 7 M2 H5N6 A/swine/Guangdong/2/2014 | R L F | |
| 28. ABI85119.1: Segmento 7 M2 H5N8 A/turkey/Ireland/1378/1983 | R L F | |
| 29. ABI85139.1: Segmento 7 M2 H5N9 A/turkey/Ontario/7732/1966 | R L F | |
| 30. ANA11403.1: Segmento 7 M2 H5N9 A/duck/France/150236/2015 | R L F | |
| 31. AAA43257.1: Segmento 7 M2 H7N1 A/FPV/Rostock/34 | R L F | |
| 32. ADR23783.1: Segmento 7 M2 H7N1 A/chicken/Rostock/45/1934 | R L F | |
| 33. ACZ48260.1: Segmento 7 M2 H7N1 A/turkey/Italy/4580/1999 | R L F | |
| 34. ABS89466.1: Segmento 7 M2 H7N1 A/turkey/Italy/4708/1999 | R L F | |
| 35. ABI85086.1: Segmento 7 M2 H7N3 A/turkey/England/1963 | R L F | |
| 36. ABV01136.1: Segmento 7 M2 H7N3 A/chicken/Victoria/224/1992 | R L F | |
| 37. ABR37409.1: Segmento 7 M2 H7N3 A/chicken/Queenland/1994 | R L F | |
| 38. ACZ48294.1: Segmento 7 M2 H7N3 A/chicken/Pakistan/447/1995 | R L F | |
| 39. ABI85040.1: Segmento 7 M2 H7N3 A/chicken/Pakistan/34669/1995 | R L F | |
| 40. ACZ48292.1: Segmento 7 M2 H7N3 A/chicken/Pakistan/1369-CR2/1995 | R L F | |
| 41. ABI85031.1: Segmento 7 M2 H7N3 A/chicken/Chile/184240-4322/2002 | R L F | |
| 42. ABI85002.1: Segmento 7 M2 H7N3 A/Canada/504/2004 | R L F | |
| 43. AAT70172.1: Segmento 7 M2 H7N3 A/GSC_chicken_B/British Columbia/04 | R L F | |
| 44. ACA25333.1: Segmento 7 M2 H7N3 A/chicken/SK/HR-00011/2007 | R L F | |
| 45. AFQ37296.1: Segmento 7 M2 H7N3 A/chicken/Jalisco/CPA1/2012 | R L F | |
| 46. AFV68716.1: Segmento 7 M2 H7N3 A/chicken/Jalisco/12283/2012 | R L F | |
| 47. ANM71958.1: Segmento 7 M2 H7N3 A/chicken/Jalisco/CPA-01859-16-CENASA-95294/2016 | R L F | |
| 48. ANM71988.1: Segmento 7 M2 H7N3 A/chicken/Puebla/CPA-04451-16-CENASA-95294/2016 | R L F | |
| 49. ABR37420.1: Segmento 7 M2 H7N4 A/chicken/New South Wales/2/1997 | R L F | |
| 50. ACZ36792.1: Segmento 7 M2 H7N7 A/chicken/Brescia/1902 | R L F | |
| 51. ABS89367.1: Segmento 7 M2 H7N7 A/chicken/Victoria/1976 | R L F | |
| 52. ABI85049.1: Segmento 7 M2 H7N7 A/goose/Leipzig/187-7/1979 | R L F | |
| 53. ABI85020.1: Segmento 7 M2 H7N7 A/chicken/Victoria/1985 | R L F | |
| 54. AMD38704.1: Segmento 7 M2 H7N8 A/turkey/Indiana/16-001403-1/2016 | R L F | |
| 55. ARG44155.1: Segmento 7 M2 H7N9 A/chicken/Guangdong/GD15/2016 | R L F | |
| 56. ARB51609.1: Segmento 7 M2 H7N9 A/chicken/Tennessee/17-007147-2/2017 | R L F | |

Figura 13: Alineamientos de las secuencias de aminoácidos de la proteína M1 y de las secuencias de aminoácidos de la proteína M2 en las posiciones 228 y 46 respectivamente asociadas a una patogenicidad de tipo consenso. En la parte superior se encuentra la cepa de referencia A / duck / Hokkaido / Vac-2/2004 (H7N7).

Abdelwhab el-SM (2015) tras las pruebas con la cepa de BP A/chicken/Italy/473/1999 y la cepa de AP A/chicken/Italy/445/1999 (ambas H7N1), concluyeron lo siguiente: Primero, el virus de BP adquirió (I) el SE Polibásico, que era importante para facilitar la diseminación sistémica y aumentar la replicación, escisión y excreción; (II) A436T, potenciando aún más el tropismo tisular; y (III) K536R, que confiere estabilidad a HA. A partir de entonces, el virus adquirió Q450L, lo que resultó en una mayor virulencia y transmisión de ave a ave. Tomados en conjunto, estas tres mutaciones únicas de HA2 aumentan de forma sinérgica la patogenicidad del VIAAP italiana H7N1 (1999) en estudios *in vivo* e *in vitro*.⁵¹

➤ Mutaciones por sustitución A436T, Q450L y K536R en la HA

A/turkey/Italy/4708/1999 y A/turkey/Italy/4580/1999 son los únicos aislamientos virales que comparten dos mutaciones en las posiciones 436 y 536 de los veintiséis aislados virales analizados, mientras que ninguna de las cepas tiene 450L. (Figura 14) Esto nos sugiere que las cepas italianas del subtipo H7N1 aisladas a partir del brote de 1999 tienen mutaciones por sustitución únicas para incrementar su patogenicidad.

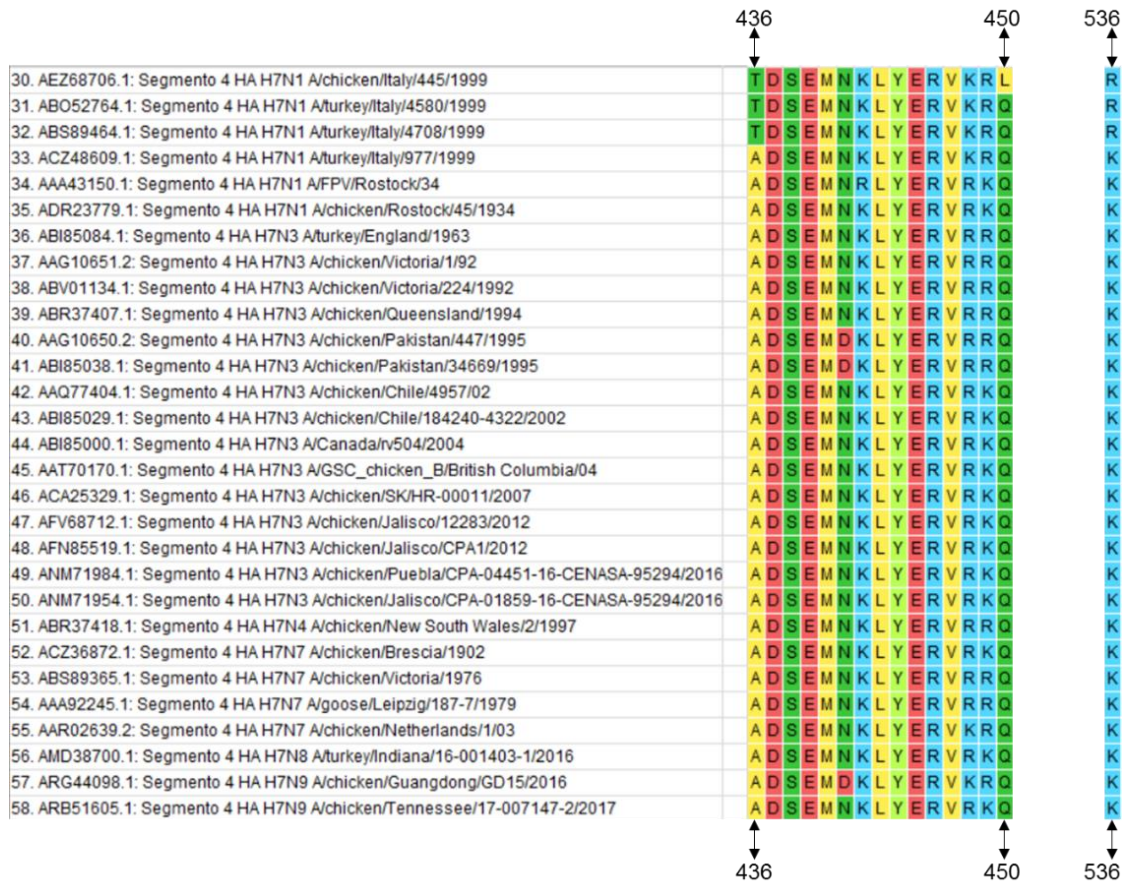


Figura 14: Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de la HA del subtipo H7 en los sitios 436, 450 y 536, asociados a una patogenicidad de tipo consenso. Las cepas de referencia A/chicken/Italy/445/1999 (H7N1) y A/chicken/Italy/445/1999 (H7N1) se localizan en la parte superior. La secuencia de HA de la cepa A/chicken/Italy/473/1999 no se encontró disponible en el Genbank, en su lugar se utilizó la secuencia de A/turkey/Italy/977/1999 la cual tiene un origen similar y está clasificada de baja patogenicidad.

VI.III.VI. Nucleoproteína (NP)

Wasilenko JL, et al. (2009) anteriormente demostraron que el intercambio de los genes NP de un virus derivado de A / Egret / HK / 757.2 / 02 (rEgret) para el gen NP de un virus recombinante de A / Ck / Indonesia / 7/03 (rIndo) en conjunto con los demás genes de rIndo resultó en una mayor replicación, expresión génica alterada y disminución del tiempo de muerte promedio (TMP) en comparación con el virus rIndo en pollos. La comparación de la secuencia de aminoácidos rIndo NP con la secuencia de aminoácidos NP del virus rEgret reveló diferencias en los aminoácidos 22, 184, 400, 406 y 423 en NP, y

posteriormente tras un estudio muy detallado también había diferencia en NS1 en la posición 148. Además, el virus rIndo produjo una disminución de la patogenicidad y la replicación en pollos en comparación con el virus silvestre A / Ck / Indonesia / 7/03 del que se deriva ⁵². La infección de pollos con rIndo resultó en un TMP de 4.1 días más largo que la del virus Indo de tipo salvaje. Al probar los virus recombinantes con mutaciones por sustituciones de forma individual en pollos, hubo la suficiente evidencia de que 184K de la proteína NP tenía el papel principal en la patogenicidad, matando a los 8 pollos en un TMP de 2 y que combinándolo con la sustitución 148E de la proteína NS1, causaba la misma mortalidad con un TMP de 1.87. ⁵³. Con esta información se basó el análisis de las secuencias de NP y de forma secundaria de NS1, para verificar la existencia de estas mutaciones por sustituciones en los virus de AP, con la ayuda de las cepa de tipo salvaje A / Ck / Indonesia / 7/03 por que porta originalmente 184K en NP y 148E en NS1.

➤ Mutaciones por sustitución E184K en la NP

De 54 secuencias de NP solo cincuenta y dos (96.29 %) portan lisina en el sitio 184, las dos cepas italianas del subtipo H7N1 si no tuvieran la eliminación en la posición 17 estarían en la misma situación. Estos resultados indican de manera general, que los VIAAP portan normalmente Lisina en el sitio 184 (Figura 15) pero se necesitan tener estudios que respalden la situación de las cepas italianas por la mutación por sustitución y la función de 183K.

➤ Mutación por sustitución G148E en la NS1

Los autores refieren que la cepa A / Ck / Indonesia / 7/03 porta 148E, pero después del alineamiento se observa que el aminoácido ácido glutámico está en

la posición 143 a causa del desplazamiento por la eliminación de 5 aminoácidos (Sitios 80-84). Entonces se determinó que independiente de las eliminaciones de aminoácidos en 11 asilados virales, solo trece de las cincuenta y siete secuencias de NS1 (22.80 %) analizadas no presentan 148E. (Figura 15). Esta mutación por sustitución no es constante para las cepas VIAAP. Pero esta una mutación por sustitución que no fue indispensable y solo fue un complemento.⁵³

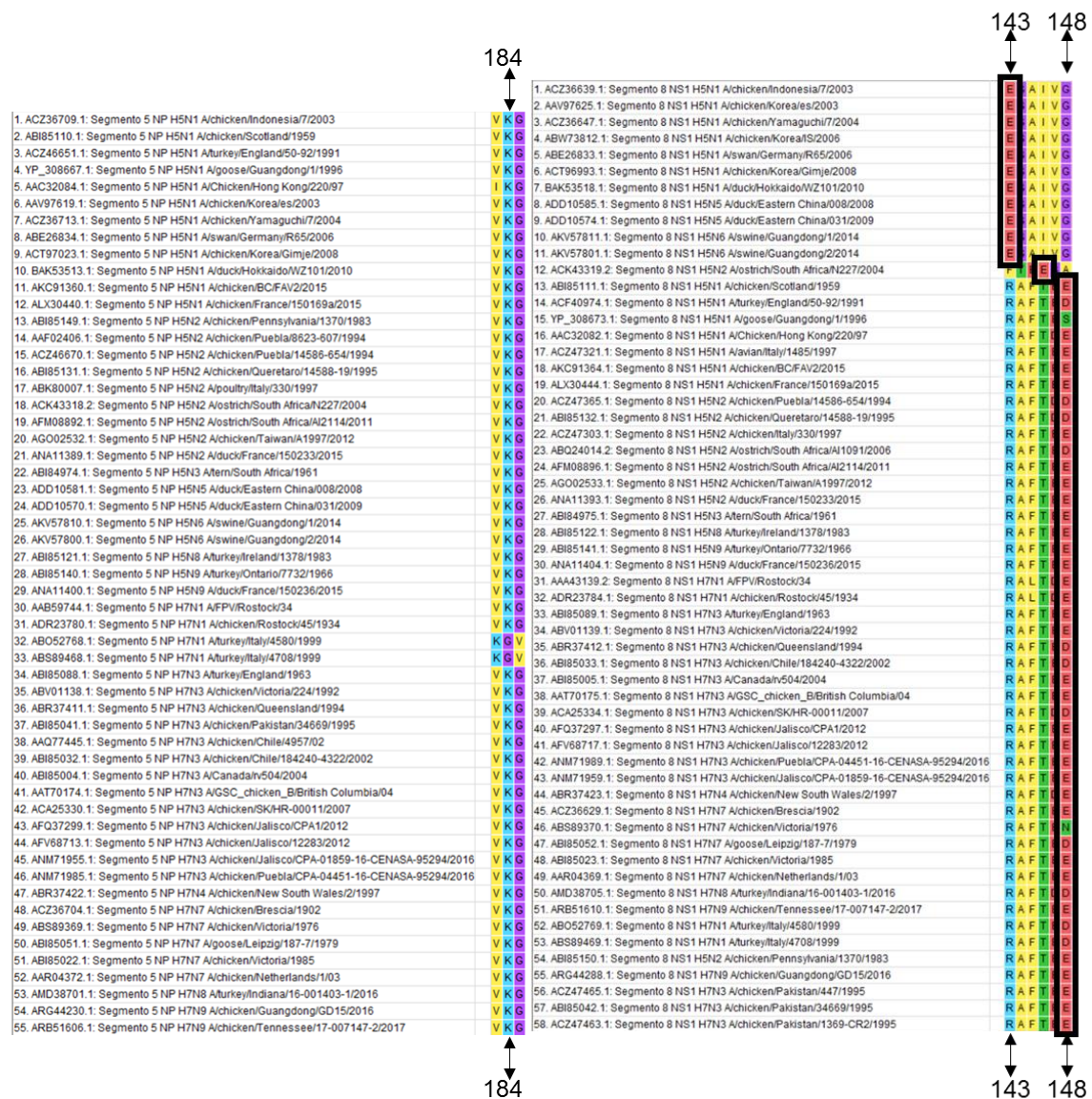


Figura 15: Alineamientos de las secuencias de aminoácidos de la Nucleoproteína y de las secuencias de aminoácidos de la proteína NS1 en las posiciones 184 y 148 respectivamente asociadas a una patogenicidad de tipo consenso. En la parte superior se localiza la cepa de referencia A / Chicken / Indonesia / 7/2003 (H5N1).

Tada T, et al. (2011) al hacer 5 pases de la cepa de AP A / duck / Yokohama / aq10 / 2003 (H5N1) específicamente en cerebro de pollo, esta adquirió la mutación por sustitución I109T en NP, la cual ocasionó una mayor replicación en fibroblastos de embrión de pollo al igual que en los pulmones, bazo y cerebros de los pollos a comparación del virus original. La cepa naturalmente provoca un TMP de 4.0 y tras utilizar la cepa con 109T en NP causó un TMP de 3.0. En forma general aumento la patogenicidad del VIAAP en las aves.⁵⁴ Por lo que se realizó el alineamiento de las secuencias de NP para verificar de las cepas VIAAP conservan esta mutación por sustitución y destacar su importancia, haciendo uso de la cepa A / duck / Yokohama / aq10 / 2003 para identificar la posición del aminoácido.

➤ Mutación por sustitución I109T en la NP

De las cincuenta y cinco secuencias de NP, ninguna de estas presentó treonina en el sitio 109 (Figura 16), esto demuestra que la mutación por sustitución I109T es un cambio único que sufrió la cepa A / duck / Yokohama / aq10 / 2003 durante su adaptación en el sistema nerviosa de las aves.

109
↑
↓

| | |
|---|-------|
| 1. BAE07156.1: Segmento 5 NP H5N1 A/duck/Yokohama/aq10/2003 | L I L |
| 2. ABI85110.1: Segmento 5 NP H5N1 A/chicken/Scotland/1959 | L I L |
| 3. ACZ46651.1: Segmento 5 NP H5N1 A/turkey/England/50-92/1991 | L I L |
| 4. YP_308667.1: Segmento 5 NP H5N1 A/goose/Guangdong/1/1996 | L I L |
| 5. AAC32084.1: Segmento 5 NP H5N1 A/Chicken/Hong Kong/220/97 | L I L |
| 6. AAV97619.1: Segmento 5 NP H5N1 A/chicken/Korea/es/2003 | L I L |
| 7. ACZ36709.1: Segmento 5 NP H5N1 A/chicken/Indonesia/7/2003 | L I L |
| 8. ACZ36713.1: Segmento 5 NP H5N1 A/chicken/Yamaguchi/7/2004 | L I L |
| 9. ABE26834.1: Segmento 5 NP H5N1 A/swan/Germany/R65/2006 | L I L |
| 10. ACT97023.1: Segmento 5 NP H5N1 A/chicken/Korea/Gimje/2008 | L I L |
| 11. BAK53513.1: Segmento 5 NP H5N1 A/duck/Hokkaido/WZ101/2010 | L I L |
| 12. AKC91360.1: Segmento 5 NP H5N1 A/chicken/BC/FAV2/2015 | L I L |
| 13. ALX30440.1: Segmento 5 NP H5N1 A/chicken/France/150169a/2015 | L I L |
| 14. ABI85149.1: Segmento 5 NP H5N2 A/chicken/Pennsylvania/1370/1983 | L I L |
| 15. AAF02406.1: Segmento 5 NP H5N2 A/chicken/Puebla/8623-607/1994 | L I L |
| 16. ACZ46670.1: Segmento 5 NP H5N2 A/chicken/Puebla/14586-654/1994 | L I L |
| 17. ABI85131.1: Segmento 5 NP H5N2 A/chicken/Queretaro/14588-19/1995 | L I L |
| 18. ABK80007.1: Segmento 5 NP H5N2 A/poultry/Italy/330/1997 | L I L |
| 19. ACK43318.2: Segmento 5 NP H5N2 A/ostrich/South Africa/N227/2004 | L I L |
| 20. AFM08892.1: Segmento 5 NP H5N2 A/ostrich/South Africa/AI2114/2011 | L I L |
| 21. AGO02532.1: Segmento 5 NP H5N2 A/chicken/Taiwan/A1997/2012 | L I L |
| 22. ANA11389.1: Segmento 5 NP H5N2 A/duck/France/150233/2015 | L I L |
| 23. ABI84974.1: Segmento 5 NP H5N3 A/tern/South Africa/1961 | L I L |
| 24. ADD10581.1: Segmento 5 NP H5N5 A/duck/Eastern China/008/2008 | L I L |
| 25. ADD10570.1: Segmento 5 NP H5N5 A/duck/Eastern China/031/2009 | L I L |
| 26. AKV57810.1: Segmento 5 NP H5N6 A/swine/Guangdong/1/2014 | L I L |
| 27. AKV57800.1: Segmento 5 NP H5N6 A/swine/Guangdong/2/2014 | L I L |
| 28. ABI85121.1: Segmento 5 NP H5N8 A/turkey/Ireland/1378/1983 | L I L |
| 29. ABI85140.1: Segmento 5 NP H5N9 A/turkey/Ontario/7732/1966 | L I L |
| 30. ANA11400.1: Segmento 5 NP H5N9 A/duck/France/150236/2015 | L I L |
| 31. AAB59744.1: Segmento 5 NP H7N1 A/FPV/Rostock/34 | L I L |
| 32. ADR23780.1: Segmento 5 NP H7N1 A/chicken/Rostock/45/1934 | L I L |
| 33. ABO52768.1: Segmento 5 NP H7N1 A/turkey/Italy/4580/1999 | L I L |
| 34. ABS89468.1: Segmento 5 NP H7N1 A/turkey/Italy/4708/1999 | L I L |
| 35. ABI85088.1: Segmento 5 NP H7N3 A/turkey/England/1963 | L I L |
| 36. ABV01138.1: Segmento 5 NP H7N3 A/chicken/Victoria/224/1992 | L I L |
| 37. ABR37411.1: Segmento 5 NP H7N3 A/chicken/Queensland/1994 | L I L |
| 38. ABI85041.1: Segmento 5 NP H7N3 A/chicken/Pakistan/34669/1995 | L I L |
| 39. AAQ77445.1: Segmento 5 NP H7N3 A/chicken/Chile/4957/02 | L I L |
| 40. ABI85032.1: Segmento 5 NP H7N3 A/chicken/Chile/184240-4322/2002 | L I L |
| 41. ABI85004.1: Segmento 5 NP H7N3 A/Canada/rv504/2004 | L I L |
| 42. AAT70174.1: Segmento 5 NP H7N3 A/GSC_chicken_B/British Columbia/04 | L I L |
| 43. ACA25330.1: Segmento 5 NP H7N3 A/chicken/SK/HR-00011/2007 | L I L |
| 44. AFO37299.1: Segmento 5 NP H7N3 A/chicken/Jalisco/CPA1/2012 | L I L |
| 45. AFV68713.1: Segmento 5 NP H7N3 A/chicken/Jalisco/12283/2012 | L I L |
| 46. ANM71955.1: Segmento 5 NP H7N3 A/chicken/Jalisco/CPA-01859-16-CENASA-95294/2016 | L I L |
| 47. ANM71985.1: Segmento 5 NP H7N3 A/chicken/Puebla/CPA-04451-16-CENASA-95294/2016 | L I L |
| 48. ABR37422.1: Segmento 5 NP H7N4 A/chicken/New South Wales/2/1997 | L I L |
| 49. ACZ36704.1: Segmento 5 NP H7N7 A/chicken/Brescia/1902 | L I L |
| 50. ABS89369.1: Segmento 5 NP H7N7 A/chicken/Victoria/1976 | L I L |
| 51. ABI85051.1: Segmento 5 NP H7N7 A/goose/Leipzig/187-7/1979 | L I L |
| 52. ABI85022.1: Segmento 5 NP H7N7 A/chicken/Victoria/1985 | L I L |
| 53. AAR04372.1: Segmento 5 NP H7N7 A/chicken/Netherlands/1/03 | L I L |
| 54. AMD38701.1: Segmento 5 NP H7N8 A/turkey/Indiana/16-001403-1/2016 | L I L |
| 55. ARG44230.1: Segmento 5 NP H7N9 A/chicken/Guangdong/GD15/2016 | L I L |
| 56. ARB51606.1: Segmento 5 NP H7N9 A/chicken/Tennessee/17-007147-2/2017 | L I L |

↑
109

Figura 16: Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de la Nucleoproteína en el sitio 109 asociado al incremento de la virulencia. En la parte superior se encuentra la cepa de referencia A / duck / Yokohama / aq10 / 2003 (H5N1).

Análisis *in silico* de las mutaciones de alta patogenicidad descritas en los virus de influenza aviar
Sergio David Rodríguez Toledano

Tada T, et al (2011) experimentaron con las siguientes cepas de AP A / chicken / Yamaguchi / 7/2004 (H5N1) la cual provoca una muerte súbita sin signos ni lesiones macroscópicas con un TMP en horas de 34 ± 2.2 y con la cepa A / duck / Yokohama / aq10 / 2003 (H5N1) la cual produce lesiones macroscópicas graves y un tiempo prolongado hasta la muerte con un TMP en horas de 87 ± 2.2 , tomando en cuenta que tienen una identidad del 98% de aminoácidos entre ellos. Se crearon varios recombinantes, donde el objetivo era que al intercambiar los segmentos entre sí mismos se encontrara el segmento o los segmentos responsables de conferirle a la cepa A / chicken / Yamaguchi / 7/2004 una virulencia más aguda en las aves. Los segmentos que destacaron fueron el 1 y el 5. Anteriormente se habló de la proteína PB2 de A / duck / Yokohama / aq10 / 2003 y su papel en la virulencia en la sección del segmento 1, por otro lado la proteína NP en este estudio demostró que la mutación por sustitución fue 105V la cual era crítica en la alta patogenicidad.³⁹

Esta evidencia experimental dio pie a la alineación de las secuencias de la proteína NP, con el propósito de ubicar 105V en las cepas y explicar su posible papel en la patogenicidad de los VIAAP.

➤ Mutación por sustitución M105V en la NP

De las cincuenta y cuatro secuencias analizadas treinta y uno (57.40 %) no tienen Valina en el sitio 105, en el caso de las cepas italianas del subtipo por poseer la pérdida de un aminoácido en la posición 17 hace que la secuencia de aminoácidos se desplace y provoque que en la posición 105 haya Arginina, pero curiosamente en el sitio 104 porta Valina. (Figura 17) Con los resultados se puede justificar que no todas las VIAAP necesitan de 105V para ser virulentas ya que A / pato / Yokohama / aq10 / 2003 normalmente presenta 105M y está clasificada como de AP, pero con 105V causa una muerte más aguda en las aves.³⁹

105
↑

| | | | |
|---|---|---|---|
| 1. BAE07156.1: Segmento 5 NP H5N1 A/duck/Yokohama/aq10/2003 | W | M | R |
| 2. ACZ36713.1: Segmento 5 NP H5N1 A/chicken/Yamaguchi/7/2004 | W | V | R |
| 3. ABI85110.1: Segmento 5 NP H5N1 A/chicken/Scotland/1959 | W | V | R |
| 4. ACZ46651.1: Segmento 5 NP H5N1 A/turkey/England/50-92/1991 | W | M | R |
| 5. YP_308667.1: Segmento 5 NP H5N1 A/goose/Guangdong/1/1996 | W | V | R |
| 6. AAC32084.1: Segmento 5 NP H5N1 A/Chicken/Hong Kong/220/97 | W | V | R |
| 7. AAV97619.1: Segmento 5 NP H5N1 A/chicken/Korea/es/2003 | W | V | R |
| 8. ACZ36709.1: Segmento 5 NP H5N1 A/chicken/Indonesia/7/2003 | W | V | R |
| 9. ABE26834.1: Segmento 5 NP H5N1 A/swan/Germany/R65/2006 | W | V | R |
| 10. ACT97023.1: Segmento 5 NP H5N1 A/chicken/Korea/Gimje/2008 | W | V | R |
| 11. BAK53513.1: Segmento 5 NP H5N1 A/duck/Hokkaido/WZ101/2010 | W | V | R |
| 12. AKC91360.1: Segmento 5 NP H5N1 A/chicken/BC/FAV2/2015 | W | M | R |
| 13. ALX30440.1: Segmento 5 NP H5N1 A/chicken/France/150169a/2015 | W | V | R |
| 14. ABI85149.1: Segmento 5 NP H5N2 A/chicken/Pennsylvania/1370/1983 | W | V | R |
| 15. AAF02406.1: Segmento 5 NP H5N2 A/chicken/Puebla/8623-607/1994 | W | M | R |
| 16. ACZ46670.1: Segmento 5 NP H5N2 A/chicken/Puebla/14586-654/1994 | W | M | R |
| 17. ABI85131.1: Segmento 5 NP H5N2 A/chicken/Queretaro/14588-19/1995 | W | M | R |
| 18. ABK80007.1: Segmento 5 NP H5N2 A/poultry/Italy/330/1997 | W | I | R |
| 19. ACK43318.2: Segmento 5 NP H5N2 A/ostrich/South Africa/N227/2004 | W | V | R |
| 20. AFM08892.1: Segmento 5 NP H5N2 A/ostrich/South Africa/AI2114/2011 | W | V | R |
| 21. AGO02532.1: Segmento 5 NP H5N2 A/chicken/Taiwan/A1997/2012 | W | V | R |
| 22. ANA11389.1: Segmento 5 NP H5N2 A/duck/France/150233/2015 | W | M | R |
| 23. ABI84974.1: Segmento 5 NP H5N3 A/tern/South Africa/1961 | W | M | R |
| 24. ADD10581.1: Segmento 5 NP H5N5 A/duck/Eastern China/008/2008 | W | M | R |
| 25. ADD10570.1: Segmento 5 NP H5N5 A/duck/Eastern China/031/2009 | W | M | R |
| 26. AKV57810.1: Segmento 5 NP H5N6 A/swine/Guangdong/1/2014 | W | I | R |
| 27. AKV57800.1: Segmento 5 NP H5N6 A/swine/Guangdong/2/2014 | W | I | R |
| 28. ABI85121.1: Segmento 5 NP H5N8 A/turkey/Ireland/1378/1983 | W | M | R |
| 29. ABI85140.1: Segmento 5 NP H5N9 A/turkey/Ontario/7732/1966 | W | M | R |
| 30. ANA11400.1: Segmento 5 NP H5N9 A/duck/France/150236/2015 | W | M | R |
| 31. AAB59744.1: Segmento 5 NP H7N1 A/FPV/Rostock/34 | W | V | R |
| 32. ADR23780.1: Segmento 5 NP H7N1 A/chicken/Rostock/45/1934 | W | V | R |
| 33. ABO52768.1: Segmento 5 NP H7N1 A/turkey/Italy/4580/1999 | V | R | E |
| 34. ABS89468.1: Segmento 5 NP H7N1 A/turkey/Italy/4708/1999 | V | R | E |
| 35. ABI85088.1: Segmento 5 NP H7N3 A/turkey/England/1963 | W | M | R |
| 36. ABV01138.1: Segmento 5 NP H7N3 A/chicken/Victoria/224/1992 | W | M | R |
| 37. ABR37411.1: Segmento 5 NP H7N3 A/chicken/Queensland/1994 | W | M | R |
| 38. ABI85041.1: Segmento 5 NP H7N3 A/chicken/Pakistan/34669/1995 | W | V | R |
| 39. AAQ77445.1: Segmento 5 NP H7N3 A/chicken/Chile/4957/02 | W | I | R |
| 40. ABI85032.1: Segmento 5 NP H7N3 A/chicken/Chile/184240-4322/2002 | W | I | R |
| 41. ABI85004.1: Segmento 5 NP H7N3 A/Canada/iv504/2004 | W | M | R |
| 42. AAT70174.1: Segmento 5 NP H7N3 A/GSC_chicken_B/British Columbia/04 | W | M | R |
| 43. ACA25330.1: Segmento 5 NP H7N3 A/chicken/SK/HR-00011/2007 | W | M | R |
| 44. AFQ37299.1: Segmento 5 NP H7N3 A/chicken/Jalisco/CPA1/2012 | W | M | R |
| 45. AFV68713.1: Segmento 5 NP H7N3 A/chicken/Jalisco/12283/2012 | W | M | R |
| 46. ANM71985.1: Segmento 5 NP H7N3 A/chicken/Puebla/CPA-04451-16-CENASA-95294/2016 | W | V | R |
| 47. ANM71955.1: Segmento 5 NP H7N3 A/chicken/Jalisco/CPA-01859-16-CENASA-95294/2016 | W | M | R |
| 48. ABR37422.1: Segmento 5 NP H7N4 A/chicken/New South Wales/2/1997 | W | I | R |
| 49. ABS89369.1: Segmento 5 NP H7N7 A/chicken/Victoria/1976 | W | V | R |
| 50. ABI85051.1: Segmento 5 NP H7N7 A/goose/Leipzig/187-7/1979 | W | I | R |
| 51. ABI85022.1: Segmento 5 NP H7N7 A/chicken/Victoria/1985 | W | V | R |
| 52. ACZ36704.1: Segmento 5 NP H7N7 A/chicken/Brescia/1902 | W | V | R |
| 53. AAR04372.1: Segmento 5 NP H7N7 A/chicken/Netherlands/1/03 | W | M | R |
| 54. AMD38701.1: Segmento 5 NP H7N8 A/turkey/Indiana/16-001403-1/2016 | W | M | R |
| 55. ARG44230.1: Segmento 5 NP H7N9 A/chicken/Guangdong/GD15/2016 | W | V | R |
| 56. ARB51606.1: Segmento 5 NP H7N9 A/chicken/Tennessee/17-007147-2/2017 | W | I | R |

↓
105

Figura 17: Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de la NP en la posición 105 relacionada al aumento de la patogenicidad. En la parte superior se localiza la cepa de referencia A / duck / Yokohama / aq10 / 2003 (H5N1).

Isoda N, et al (2013) trabajaron con la cepa A / duck / Mongolia / 47/2001 (H7N1) cuyo IPIV hacía referencia a un virus de BP, pero en la prueba de IPIC resulto con 1.3, siendo esta evidencia muy contundente en la realización del experimento para determinar los factores que influyen en el comportamiento patógeno de este virus. Se utilizó la cepa de BP A / duck / Mongolia / 867/2002 (H7N1) cuyo IPIV e IPIC es de 0.0 cada uno, se crearon varios recombinantes entre ambas cepas, intercambiando cada uno de sus segmentos, los cuales se probaron en pollos, demostrando así que la proteína principal para incrementar el IPIC en la cepa A / duck / Mongolia / 47/2001 fue NP. Al hacer la comparación entre las NP de 47/01 y 867/02, se encontraron siete diferencias de aminoácidos en las posiciones 34, 50, 98, 319, 350, 352 y 384. De nuevo se crearon virus recombinantes de la cepa 867/02 con las siguientes sustituciones en NP: S34G, S50N, F98K, K319N, T350A, V352M y Q384R. Las sustituciones se probaron de forma individual y en conjunto en pollos. Al final se aseguró experimentalmente que el recombinante rg-867/02 con las sustituciones S50N y F98K de manera sinérgica provocaron un IPIC de 1.55, aunque también causaron una leve elevación en el IPIC de forma individual (0.93 y 0.61 respectivamente).⁵⁵ Por esta situación se buscaron estas mutaciones por sustitución en las cepas disponibles, y con ello tener un panorama más acertado de la presencia de estas sustituciones y su posible papel en el comportamiento de los VIAAP, utilizando las cepas A / duck / Mongolia / 867/2002 y A / duck / Mongolia / 47/2001 como referencia para la búsqueda de las posiciones.

➤ Mutación por sustitución S50N en la NP

De un total de cincuenta y cinco secuencias, solo cincuenta y tres cepas (96.36 %) conservan serina en la posición 50, y las dos cepas italianas del subtipo H7N1 ácido aspártico y en el sitio 49 serina debido a la eliminación de un aminoácido en la posición 17, pero en general no se puede dar una conclusión muy clara, ya que la cepa A / duck / Mongolia / 867/2002 y A / duck / Mongolia / 47/2001 portan asparagina y serina respectivamente en ese sitio, (Figura 18) teniendo un resultado contrario a lo que menciona Isoda N. (2013), donde describe que de forma original A / duck / Mongolia / 867/2002 y A / duck / Mongolia / 47/2001 contienen serina y asparagina respectivamente.⁵⁵ Las secuencias de las cepas de referencia fueron secuenciadas y registradas por el mismo autor en el GenBank.

➤ Mutación por sustitución F98K en la NP

Cincuenta secuencias de las cincuenta y cinco (90.90 %) no presentan lisina en el sitio 98, nuevamente hay un error en la precisión de las cepas de referencia, en este caso solo es A / duck / Mongolia / 867/2002, ya que en el trabajo experimental marca una fenilalanina en esta posición y en su lugar tiene una arginina. (Figura 18)

| | 50 | 98 |
|---|-------|-------|
| 1. BAF02910.2: Segmento 5 NP H7N1 A/duck/Mongolia/47/2001 | L S D | Y K R |
| 2. BAH03373.1: Segmento 5 NP H7N1 A/duck/Mongolia/867/2002 | L N D | Y R R |
| 3. ABI85110.1: Segmento 5 NP H5N1 A/chicken/Scotland/1959 | L S D | Y R R |
| 4. ACZ46651.1: Segmento 5 NP H5N1 A/turkey/England/50-92/1991 | L S D | Y R R |
| 5. YP_308667.1: Segmento 5 NP H5N1 A/goose/Guangdong/1/1996 | L S D | Y R R |
| 6. AAC32084.1: Segmento 5 NP H5N1 A/Chicken/Hong Kong/220/97 | L S D | Y R R |
| 7. AAV97619.1: Segmento 5 NP H5N1 A/chicken/Korea/es/2003 | L S D | Y R R |
| 8. ACZ36709.1: Segmento 5 NP H5N1 A/chicken/Indonesia/7/2003 | L S D | Y R R |
| 9. ACZ36713.1: Segmento 5 NP H5N1 A/chicken/Yamaguchi/7/2004 | L S D | Y R R |
| 10. ABE26834.1: Segmento 5 NP H5N1 A/swan/Germany/R65/2006 | L S D | Y R R |
| 11. ACT97023.1: Segmento 5 NP H5N1 A/chicken/Korea/Gimje/2008 | L S D | Y R R |
| 12. BAK53513.1: Segmento 5 NP H5N1 A/duck/Hokkaido/WZ101/2010 | L S D | Y R R |
| 13. AKC91360.1: Segmento 5 NP H5N1 A/chicken/BC/FAV2/2015 | L S D | Y R R |
| 14. ALX30440.1: Segmento 5 NP H5N1 A/chicken/France/150169a/2015 | L G D | Y R R |
| 15. ABI85149.1: Segmento 5 NP H5N2 A/chicken/Pennsylvania/1370/1983 | L S D | Y R R |
| 16. AAF02406.1: Segmento 5 NP H5N2 A/chicken/Puebla/8623-607/1994 | L S D | Y K R |
| 17. ACZ46670.1: Segmento 5 NP H5N2 A/chicken/Puebla/14586-654/1994 | L S D | Y K R |
| 18. ABI85131.1: Segmento 5 NP H5N2 A/chicken/Queretaro/14588-19/1995 | L S D | Y K R |
| 19. ABK80007.1: Segmento 5 NP H5N2 A/poultry/Italy/330/1997 | L S D | Y R R |
| 20. ACK43318.2: Segmento 5 NP H5N2 A/ostrich/South Africa/N227/2004 | L S D | Y R R |
| 21. AFM08892.1: Segmento 5 NP H5N2 A/ostrich/South Africa/AI2114/2011 | L S D | Y R R |
| 22. AGO02532.1: Segmento 5 NP H5N2 A/chicken/Taiwan/A1997/2012 | L S D | Y R R |
| 23. ANA11389.1: Segmento 5 NP H5N2 A/duck/France/150233/2015 | L S D | Y R R |
| 24. ABI84974.1: Segmento 5 NP H5N3 A/tern/South Africa/1961 | L S D | Y R R |
| 25. ADD10581.1: Segmento 5 NP H5N5 A/duck/Eastern China/008/2008 | L S D | Y R R |
| 26. ADD10570.1: Segmento 5 NP H5N5 A/duck/Eastern China/031/2009 | L S D | Y R R |
| 27. AKV57810.1: Segmento 5 NP H5N6 A/swine/Guangdong/1/2014 | L S D | Y R R |
| 28. AKV57800.1: Segmento 5 NP H5N6 A/swine/Guangdong/2/2014 | L S D | Y R R |
| 29. ABI85121.1: Segmento 5 NP H5N8 A/turkey/Ireland/1378/1983 | L S D | Y R R |
| 30. ABI85140.1: Segmento 5 NP H5N9 A/turkey/Ontario/7732/1966 | L S D | Y R R |
| 31. ANA11400.1: Segmento 5 NP H5N9 A/duck/France/150236/2015 | L S D | Y R R |
| 32. AAB59744.1: Segmento 5 NP H7N1 A/FPV/Rostock/34 | L S D | Y R R |
| 33. ADR23780.1: Segmento 5 NP H7N1 A/chicken/Rostock/45/1934 | L S D | Y R R |
| 34. ABO52768.1: Segmento 5 NP H7N1 A/turkey/Italy/4580/1999 | S D Y | R R R |
| 35. ABS89468.1: Segmento 5 NP H7N1 A/turkey/Italy/4708/1999 | S D Y | R R R |
| 36. ABI85088.1: Segmento 5 NP H7N3 A/turkey/England/1963 | L S D | Y R R |
| 37. ABV01138.1: Segmento 5 NP H7N3 A/chicken/Victoria/224/1992 | L S D | Y R R |
| 38. ABR37411.1: Segmento 5 NP H7N3 A/chicken/Queensland/1994 | L S D | Y R R |
| 39. ABI85041.1: Segmento 5 NP H7N3 A/chicken/Pakistan/34669/1995 | L S D | Y R R |
| 40. AAQ77445.1: Segmento 5 NP H7N3 A/chicken/Chile/4957/02 | L S D | Y R R |
| 41. ABI85032.1: Segmento 5 NP H7N3 A/chicken/Chile/184240-4322/2002 | L S D | Y R R |
| 42. ABI85004.1: Segmento 5 NP H7N3 A/Canada/iv504/2004 | L S D | Y K R |
| 43. AAT70174.1: Segmento 5 NP H7N3 A/GSC_chicken_B/British Columbia/04 | L S D | Y K R |
| 44. ACA25330.1: Segmento 5 NP H7N3 A/chicken/SK/HR-00011/2007 | L S D | Y R R |
| 45. AFQ37299.1: Segmento 5 NP H7N3 A/chicken/Jalisco/CPA1/2012 | L S D | Y R R |
| 46. AFV68713.1: Segmento 5 NP H7N3 A/chicken/Jalisco/12283/2012 | L S D | Y R R |
| 47. ANM71985.1: Segmento 5 NP H7N3 A/chicken/Puebla/CPA-04451-16-CENASA-95294/2016 | L S D | Y R R |
| 48. ANM71955.1: Segmento 5 NP H7N3 A/chicken/Jalisco/CPA-01859-16-CENASA-95294/2016 | L S D | Y R R |
| 49. ABR37422.1: Segmento 5 NP H7N4 A/chicken/New South Wales/2/1997 | L S D | Y R R |
| 50. ABS89369.1: Segmento 5 NP H7N7 A/chicken/Victoria/1976 | L S D | Y R R |
| 51. ABI85051.1: Segmento 5 NP H7N7 A/goose/Leipzig/187-7/1979 | L S D | Y R R |
| 52. ABI85022.1: Segmento 5 NP H7N7 A/chicken/Victoria/1985 | L S D | Y R R |
| 53. ACZ36704.1: Segmento 5 NP H7N7 A/chicken/Brescia/1902 | L S D | Y R R |
| 54. AAR04372.1: Segmento 5 NP H7N7 A/chicken/Netherlands/1/03 | L S D | Y R R |
| 55. AMD38701.1: Segmento 5 NP H7N8 A/turkey/Indiana/16-001403-1/2016 | L S D | Y R R |
| 56. ARG44230.1: Segmento 5 NP H7N9 A/chicken/Guangdong/GD15/2016 | L S D | Y R R |
| 57. ARB51606.1: Segmento 5 NP H7N9 A/chicken/Tennessee/17-007147-2/2017 | L S D | Y R R |

Figura 18: Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de la NP en los sitios 50 y 98 asociados a una patogenicidad de tipo consenso. En la parte superior se encuentran las cepas de referencias A / duck / Mongolia / 47/2001 (H7N1) y A / duck / Mongolia / 867/2002 (H7N1).

Análisis *in silico* de las mutaciones de alta patogenicidad descritas en los virus de influenza aviar
Sergio David Rodríguez Toledano

VI.III.VII. Neuraminidasa (NA)

Munier S. (2010), Stech O. (2015), Hoffmann T.W. (2012) usando subtipos con N1 y Sorrell EM (2010) con el subtipo H2N2, demostraron que la eliminación de una cierta cantidad de aminoácidos (19-27) en las posiciones de aminoácidos 54-72, 49-68, 54-72 y 54-81 respectivamente en el tallo de la NA es responsable principalmente de la adaptación y el aumento de la patogenicidad, replicación y transmisión del virus en las aves de corral, caracterizando tal mutación como un marcador de adaptación en pollos.⁵⁶ Por lo que se prosiguió a comparar secuencias de las cepas de IAAP, seleccionando las cepas cuyo subtipo son HXN1, para evaluar si el tamaño del tallo de la neuraminidasa (NA) tiene correlación directa al comportamiento de los virus. La cepa A/Mallard/Marquenterre/Z237/83 (H1N1) se usó de referencia, debido a que se demostró que al perder 19 aminoácidos en el tallo de la NA, obtuvo una mejor adaptación en aves de corral, ventaja en el crecimiento moderado en cultivos de células aviares, y en pollos de 4 semanas mejora la replicación en pulmones, hígado y riñón y las lesiones de neumonía intersticial fueron más severas,⁵⁶. La secuencia de la NA fue de 469 aminoácidos en los subtipos HXN1.

➤ Mutación por eliminación en el tallo de la NA en los subtipos N1

Tres de dieciséis cepas (18.75 %) que son del subtipo H5N1: A/chicken/Scotland/1959_A/goose/Guangdong/1/1996_A/chicken/France/15016 9a/2015, después de hacer el análisis, se observó que a pesar de ser consideradas de alta patogenicidad, carecen de la eliminación de aminoácidos en el tallo de la NA. (Figura 19) Esta evidencia confirma que algunos subtipos H5N1 de IAAP no cumplen con este criterio.

Se continuó comparando las secuencias con aislamientos virales cuyo subtipo fue HXN2, para ratificar si el tamaño del tallo de la NA tiene correlación directa al comportamiento de los virus. La cepa A/Mallard/0Potsdam/178-4/83 (H2N2) se usó de referencia, debido a que se demostró que al perder 27 aminoácidos en el tallo de la NA, obtuvo un cambio en el tropismo del virus desde el intestino hasta el tracto respiratorio para replicarse en los pollos,⁵⁷ siendo clave para identificar el número de aminoácidos exactos en la secuencia de la NA, el cual es de 469 en los subtipos HXN2.

➤ Mutación por eliminación en el tallo de la NA en los subtipos N2

Cinco de diez cepas (50 %) que son del subtipo H5N2: A/chicken/Italy/330/1997; A/ostrich/South Africa/N227/2004; A/ostrich/South Africa/AI1091/2006; A/ostrich/South Africa/AI2114/2011; A/duck/France/150233/2015, después de hacer el análisis, muestran ausencia de la eliminación de aminoácidos en el tallo de la NA. (Figura 19) Destacando que algunos aislamientos de virus del subtipo H5N2 de IAAP no cumplen con este requisito para la adaptación.

No se obtuvo evidencia experimental donde se utilizaran virus de los subtipos N3, N4, N5, N6, N7, N8 o N9 para comprobar que la pérdida de aminoácidos en el tallo de la NA mejora la adaptación en aves de corral. Por lo que consecuentemente no hubo cepas de referencia de estos mismos subtipos.

➤ Mutación por eliminación en el tallo de la NA en los subtipos N3

Once de doce cepas (91.66 %) la cuales son: A/tern/South Africa/1961; A/chicken/Victoria/224/1992_A/chicken/Queensland/1994_A/chicken/Pakistan/34669/1995_A/chicken/Chile/4957/02_A/Canada/rv504/2004_A/GSC_chicken_B/BritishColumbia/04_A/chicken/SK/HR00011/2007_A/chicken/Jalisco/CPA1/2012_A/chicken/Puebla/CPA-04451-16-CENASA-95294/2016_A/chicken/Jalisco/CPA-01859-16-CENASA-95294/2016, después de hacer el análisis, muestran que estos aislamientos virales no presentan una supresión de aminoácidos, si se compara con la eliminación de 28 aminoácidos (posición 50-77) del virus A/turkey/England/1963 del subtipo H7N3., caracterizando a las diez primeras cepas con un total de 469 aminoácidos en el tallo de la NA. (Figura 19) Lo anterior muestra que la mayoría de los subtipos H7N3 de IAAP carecen de la mutación por eliminación.

➤ Mutación por eliminación en el tallo de la NA en los subtipos N4

La única cepa A/chicken/New South Wales/2/1997 del subtipo H7N4 no se pudo evaluar la pérdida de aminoácidos por no existir una secuencia de referencia, pero presenta un total de 470 aminoácidos en la secuencia de la NA que es 1 aminoácido mayor que la N1. (Figura 19)

➤ Mutación por eliminación en el tallo de la NA en los subtipos N5

Las únicas dos cepas del subtipo H5N5 A/duck/Eastern China/008/2008 y A/duck/Eastern China/031/2009, después del análisis, no se distingue una pérdida de aminoácidos, (Figura 19) destacando también que Gu M. (2011) no menciona una mutación por eliminación en ambas cepas,⁵⁸ asegurando que el subtipo N5 tiene un total de 472 aminoácidos en el la secuencia de la NA.

➤ Mutación por eliminación en el tallo de la NA en los subtipos N6

Las únicas dos cepas del subtipo H5N6 A/swine/Guangdong/1/2014 y A/swine/Guangdong/2/2014, después del análisis, se apreció la pérdida de aminoácidos en el tallo, siendo exactos 11 aminoácidos dentro de la región del tallo (posiciones del 59-69) tal y como lo menciona Li X. (2015),⁵⁹ confirmando que el subtipo N6 tiene un total de 470 aminoácidos en la secuencia de la NA.(Figura 19) Pero no fue posible comprobar algo, ya que no se dispuso de cepas N5 de impacto en la industria avícola reportadas por la OIE y con secuencias disponibles en el GenBank.

➤ Mutación por eliminación en el tallo de la NA en los subtipos N7

Cuatro de las cinco cepas (80 %) que son del subtipo H7N7: A/chicken/Brescia/1902; A/chicken/Victoria/1976; A/chicken/Victoria/1985; A/chicken/Netherlands/1/03, no mostraron una eliminación de aminoácidos en el tallo, si se compara con la cepa A/goose/Leipzig/187-7/1979 del subtipo H7N7, la cual tuvo una pérdida de 36 aminoácidos repartida en dos sitios dentro de la región de eliminación (posiciones 40-73 y 76-77), caracterizando a las tres primeras VIA con un total de 471 aminoácidos en la secuencia de la NA. (Figura 19) Por lo tanto la eliminación de estos aminoácidos no es consenso para este subtipo.

En el análisis de la mutación por sustitución S188N en el cual la cepa A/goose/Leipzig/187-7/1979 fue la única que presento el sitio de N-glicosilación (Figura 9) y a la vez un tallo corto de la neuraminidasa (Figura 19), este resultado habla de un posible equilibrio que hay entre la HA-NA anteriormente ya tratado.⁴⁵

➤ Mutación por eliminación en el tallo de la NA en los subtipos N8

Las únicas dos cepas *A/turkey/Ireland/1378/1983* del subtipo H5N8 y *A/turkey/Indiana/16-001403-1/2016* del subtipo H7N8, después del análisis, no se observó eliminación de aminoácidos en la región del tallo, presentando las dos cepas un total de 470 aminoácidos cada una en el tallo de la NA. (Figura 19) Por lo tanto la eliminación de estos aminoácidos no es consenso para este subtipo.

➤ Mutación por eliminación en el tallo de la NA en los subtipos N9

Dos de las tres cepas (66.66 %): *A/duck/France/150236/2015* del subtipo H5N9 y *A/chicken/Tennessee/17-007147-2/2017* del subtipo H7N9, no mostraron la pérdida de aminoácidos en el tallo si se compara con la cepa *A/chicken/Guangdong/GD15/2016* del subtipo H7N9, la cual tuvo una pérdida de 5 aminoácidos dentro de la región de eliminación (posición 71-75), caracterizando a las dos primeras cepas con un total de 470 aminoácidos en la secuencia de la NA. (Figura 19) Sugiriendo que este subtipo no está dentro de la regla de la mutación por supresión y su adaptación.

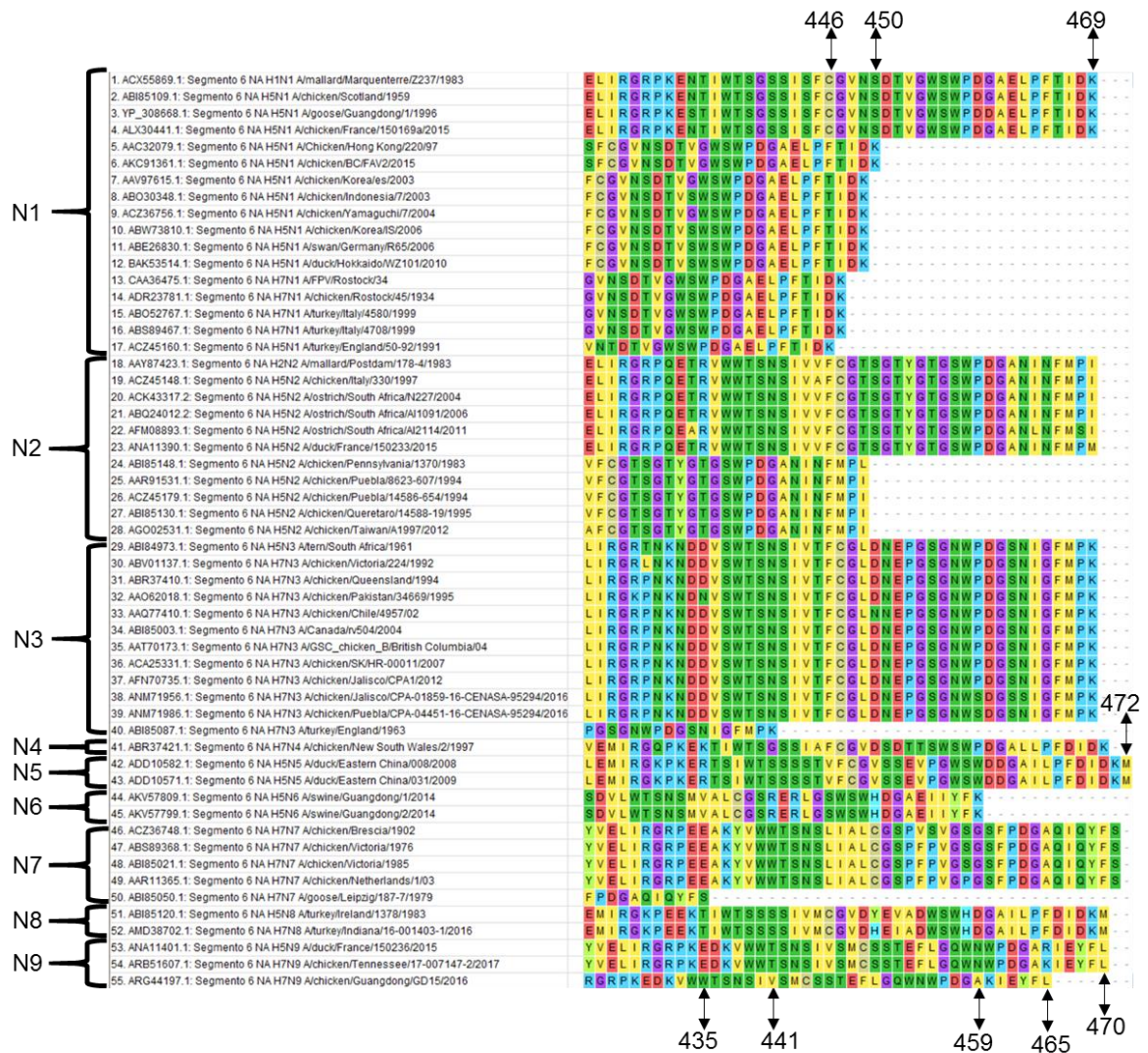


Figura 19: Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de la Neuraminidasa en la región terminal. Las cepas de referencia A/Mallard/Marquenterre/Z237/83 (H1N1) y A/Mallard/0Potsdam/178-4/83 (H2N2) están enlistadas en los números 1 y 18 respectivamente.

VI.III.VIII. Proteína de Matriz 1 (M1)

Pu J, et al. (2017) intercambiaron segmentos de la proteína M1 en dos cepas y detectaron que cada uno de los cinco residuos de aminoácidos en M1-T37A, M1-R95K, M1-S224N, M1-K242N y M2-D21G de la cepa A / quail / Hong Kong / G1 / 1997 (H9N2) le conferían a la cepa A / chicken / Beijing / 1/1994 (H9N2) de manera sinérgica al inocularla en pollos por vía intranasal, una replicación mayor con un inicio más temprano en su liberación, inflamación pulmonar más severa, con neumonía intersticial y bronconeumonía

Análisis *in silico* de las mutaciones de alta patogenicidad descritas en los virus de influenza aviar

Sergio David Rodríguez Toledano

caracterizada por consolidación intersticial alveolar, infiltración extensa de células inflamatorias, desprendimiento del revestimiento epitelial mucoso, una propagación extra pulmonar, observando también congestión renal.⁶⁰ Por ello se trabajó con las secuencias de M1 para determinar la presencia de estas mutaciones por sustitución en los VIAAP utilizando los virus A / quail / Hong Kong / G1 / 1997 y A / chicken / Beijing / 1/1994, las cuales fueron guía en la búsqueda de los sitios con sus aminoácidos correspondientes.

La cepa utilizada como referencia A / quail / Hong Kong / G1 / 1997 no concuerda con los aminoácidos mencionados por Pu J. (2017), por lo que se infiere en una situación: el virus fue modificado anteriormente en laboratorio provocando los cambios y cuya secuencia no es la misma que la reportada en el artículo. De forma exacta los aminoácidos de la cepa de baja patogenicidad coincidieron.

➤ Mutaciones por sustitución T37A, R95K, S224N y K242N en la M1

En la proteína M1; cincuenta y siete de sesenta cepas (95 %) no coinciden con 37A pero si con 37T; cincuenta y un cepas (85 %) portan 95R en vez de 95K; cuarenta y siete cepas (78.33 %) presentan 224S y no 224N; cincuenta y seis cepas (93.33 %) no cuentan con 242N (Figura 20).

➤ Mutación por sustitución D21G en la M2

En la proteína M2: cincuenta y tres de cincuenta y cinco secuencias (96.36 %) la sustitución D21G no existe (Figura 20).

La única cepa que cumplió con todas las mutaciones por sustitución fue A/chicken/Guangdong/GD15/2016 (H7N9). (Figura 20) En el trabajo se habla de Análisis *in silico* de las mutaciones de alta patogenicidad descritas en los virus de influenza aviar
Sergio David Rodríguez Toledano

que anteriormente demostraron que los virus H9N2 de genotipo G57 se han vuelto predominantes en pollos desde 2010 y que los virus de tipo genotipo G57 con mayor infectividad y deriva antigénica causaron brotes nacionales en parvadas de pollos durante 2010-2013, que los mismos portan firmemente la proteína M1 que se relaciona con la de la cepa A / quail / Hong Kong / G1 / 1997,⁶⁰ por lo que la cepa A/chicken/Guangdong/GD15/2016 puede estar compartiendo la misma proteína.

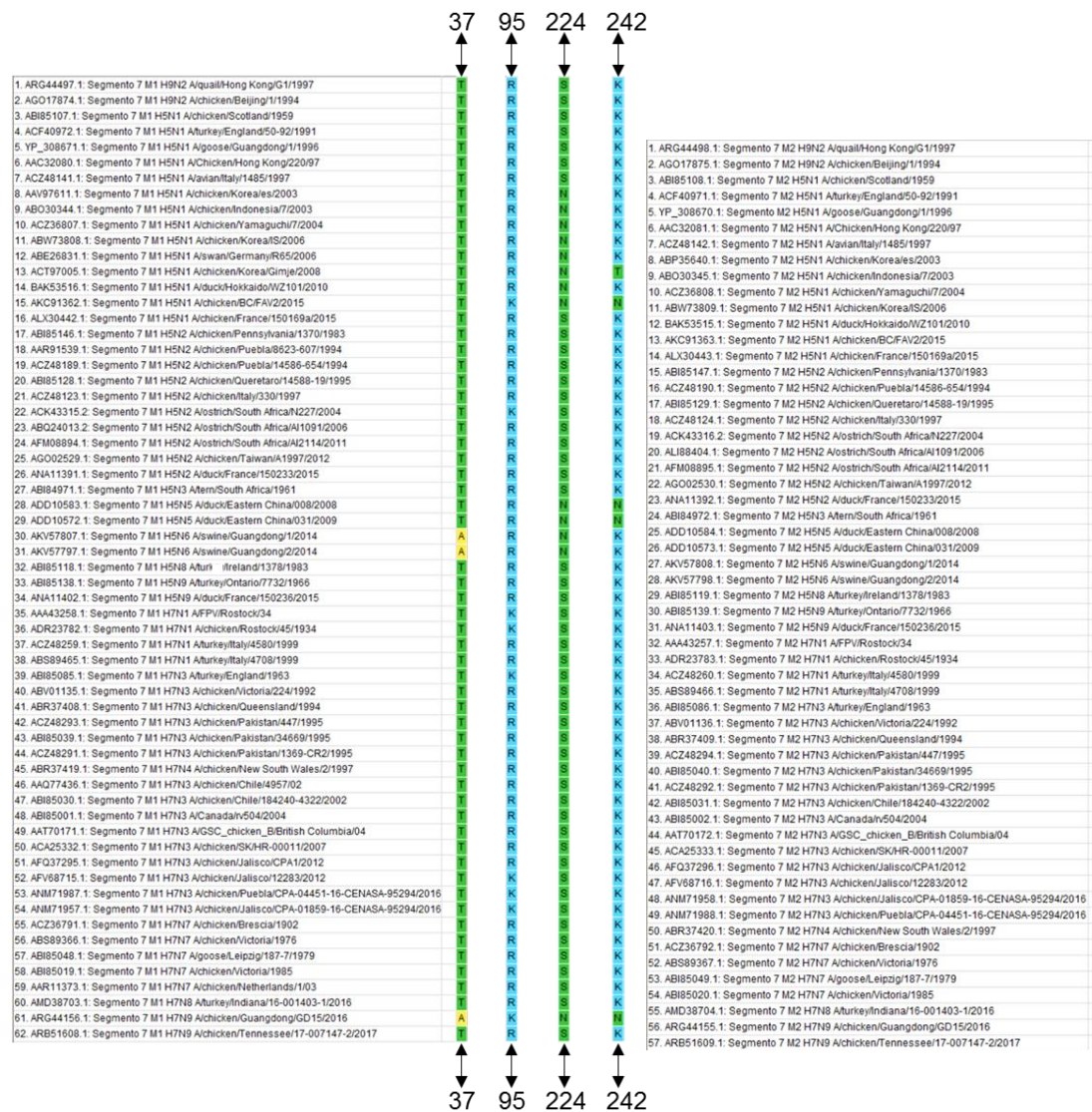


Figura 20: Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de la proteína M1 en los sitios 37, 95, 224 y 242, y alineamiento de las secuencias de aminoácidos de la proteína M2 en la posición 21 que en conjunto están relacionados a una patogenicidad de tipo consenso. En la parte superior se localizan las cepas de referencia A / quail / Hong Kong / G1 / 1997 (H9N2) y A / chicken / Beijing / 1/1994 (H9N2).

Nao N. et al. (2015) experimentaron con dos virus distintos de AP: A / duck / Hokkaido / WZ83 / 2010 (H5N1) (WZ83) y A / duck / Hokkaido / WZ101 / 2010 (H5N1) (WZ101). Al compararlas genéticamente resultaron muy similares con dos diferencias de aminoácidos en sus proteínas M1 y PB1 en las posiciones 43 y 317 respectivamente. Encontraron que tanto WZ83 como WZ101 causaron infección letal en pollos, pero WZ101 mata más rápidamente que WZ83. Curiosamente, los patos infectados experimentalmente con WZ83 mostraron signos clínicos leves o ausencia de los mismos, mientras que WZ101 fue altamente letal. Después generaron virus híbridos con sus segmentos entre estos virus y descubrieron que el intercambio del segmento del gen M cambiaba completamente el fenotipo patogénico tanto en pollos como en patos. Indicando que la diferencia en la patogenicidad para estas especies aviares entre WZ83 y WZ101 se determinó solo por un único aminoácido en la proteína M1 el cual fue metionina en la posición 43. Estos resultados sugieren que este aminoácido en tal posición de la proteína M1 es uno de los factores que contribuyen a la patogenicidad de los virus de la influenza aviar altamente patógena H5N1⁶¹. Se llevó a cabo la selección de las secuencias con base a la proteína M1 para confirmar la presencia de esta mutación por sustitución en las cepas de VIAAP.

➤ Mutación por sustitución I43M en la M1

Las cincuenta y nueve secuencias de M1 analizadas tienen metionina en la posición 43 (Figura 21), evidenciando que es un aminoácido conservado en las cepas de alta patogenicidad analizadas y que es necesario para la virulencia.

43
↑

| | |
|---|-------|
| 1. BAK53505.1: Segmento 7 M1 H5N1 A/duck/Hokkaido/WZ83/2010 | L I E |
| 2. BAK53516.1: Segmento 7 M1 H5N1 A/duck/Hokkaido/WZ101/2010 | L M E |
| 3. ABI85107.1: Segmento 7 M1 H5N1 A/chicken/Scotland/1959 | L M E |
| 4. ACF40972.1: Segmento 7 M1 H5N1 A/turkey/England/50-92/1991 | L M E |
| 5. YP_308671.1: Segmento 7 M1 H5N1 A/goose/Guangdong/1/1996 | L M E |
| 6. AAC32080.1: Segmento 7 M1 H5N1 A/Chicken/Hong Kong/220/97 | L M E |
| 7. ACZ48141.1: Segmento 7 M1 H5N1 A/avian/Italy/1485/1997 | L M E |
| 8. AAV97611.1: Segmento 7 M1 H5N1 A/chicken/Korea/es/2003 | L M E |
| 9. ABO30344.1: Segmento 7 M1 H5N1 A/chicken/Indonesia/7/2003 | L M E |
| 10. ACZ36807.1: Segmento 7 M1 H5N1 A/chicken/Yamaguchi/7/2004 | L M E |
| 11. ABW73808.1: Segmento 7 M1 H5N1 A/chicken/Korea/IS/2006 | L M E |
| 12. ABE26831.1: Segmento 7 M1 H5N1 A/swan/Germany/R65/2006 | L M E |
| 13. ACT97005.1: Segmento 7 M1 H5N1 A/chicken/Korea/Gimje/2008 | L M E |
| 14. AKC91362.1: Segmento 7 M1 H5N1 A/chicken/BC/FAV2/2015 | L M E |
| 15. ALX30442.1: Segmento 7 M1 H5N1 A/chicken/France/150169a/2015 | L M E |
| 16. ABI85146.1: Segmento 7 M1 H5N2 A/chicken/Pennsylvania/1370/1983 | L M E |
| 17. AAR91539.1: Segmento 7 M1 H5N2 A/chicken/Puebla/8623-607/1994 | L M E |
| 18. ACZ48189.1: Segmento 7 M1 H5N2 A/chicken/Puebla/14586-654/1994 | L M E |
| 19. ABI85128.1: Segmento 7 M1 H5N2 A/chicken/Queretaro/14588-19/1995 | L M E |
| 20. ACZ48123.1: Segmento 7 M1 H5N2 A/chicken/Italy/330/1997 | L M E |
| 21. ACK43315.2: Segmento 7 M1 H5N2 A/ostrich/South Africa/N227/2004 | L M E |
| 22. ABQ24013.2: Segmento 7 M1 H5N2 A/ostrich/South Africa/AI1091/2006 | L M E |
| 23. AFM08894.1: Segmento 7 M1 H5N2 A/ostrich/South Africa/AI2114/2011 | L M E |
| 24. AGO02529.1: Segmento 7 M1 H5N2 A/chicken/Taiwan/A1997/2012 | L M E |
| 25. ANA11391.1: Segmento 7 M1 H5N2 A/duck/France/150233/2015 | L M E |
| 26. ABI84971.1: Segmento 7 M1 H5N3 A/tern/South Africa/1961 | L M E |
| 27. ADD10583.1: Segmento 7 M1 H5N5 A/duck/Eastern China/008/2008 | L M E |
| 28. ADD10572.1: Segmento 7 M1 H5N5 A/duck/Eastern China/031/2009 | L M E |
| 29. AKV57807.1: Segmento 7 M1 H5N6 A/swine/Guangdong/1/2014 | L M E |
| 30. AKV57797.1: Segmento 7 M1 H5N6 A/swine/Guangdong/2/2014 | L M E |
| 31. ABI85118.1: Segmento 7 M1 H5N8 A/turkey/Ireland/1378/1983 | L M E |
| 32. ABI85138.1: Segmento 7 M1 H5N9 A/turkey/Ontario/7732/1966 | L M E |
| 33. ANA11402.1: Segmento 7 M1 H5N9 A/duck/France/150236/2015 | L M E |
| 34. AAA43258.1: Segmento 7 M1 H7N1 A/FPV/Rostock/34 | L M E |
| 35. ADR23782.1: Segmento 7 M1 H7N1 A/chicken/Rostock/45/1934 | L M E |
| 36. ACZ48259.1: Segmento 7 M1 H7N1 A/turkey/Italy/4580/1999 | L M E |
| 37. ABS89465.1: Segmento 7 M1 H7N1 A/turkey/Italy/4708/1999 | L M E |
| 38. ABI85085.1: Segmento 7 M1 H7N3 A/turkey/England/1963 | L M E |
| 39. ABV01135.1: Segmento 7 M1 H7N3 A/chicken/Victoria/224/1992 | L M E |
| 40. ABR37408.1: Segmento 7 M1 H7N3 A/chicken/Queensland/1994 | L M E |
| 41. ACZ48293.1: Segmento 7 M1 H7N3 A/chicken/Pakistan/447/1995 | L M E |
| 42. ABI85039.1: Segmento 7 M1 H7N3 A/chicken/Pakistan/34669/1995 | L M E |
| 43. ACZ48291.1: Segmento 7 M1 H7N3 A/chicken/Pakistan/1369-CR2/1995 | L M E |
| 44. ABR37419.1: Segmento 7 M1 H7N4 A/chicken/New South Wales/2/1997 | L M E |
| 45. AAQ77436.1: Segmento 7 M1 H7N3 A/chicken/Chile/4957/02 | L M E |
| 46. ABI85030.1: Segmento 7 M1 H7N3 A/chicken/Chile/184240-4322/2002 | L M E |
| 47. ABI85001.1: Segmento 7 M1 H7N3 A/Canada/iv504/2004 | L M E |
| 48. AAT70171.1: Segmento 7 M1 H7N3 A/GSC_chicken_B/British Columbia/04 | L M E |
| 49. ACA25332.1: Segmento 7 M1 H7N3 A/chicken/SK/HR-00011/2007 | L M E |
| 50. AFQ37295.1: Segmento 7 M1 H7N3 A/chicken/Jalisco/CPA1/2012 | L M E |
| 51. AFV68715.1: Segmento 7 M1 H7N3 A/chicken/Jalisco/12283/2012 | L M E |
| 52. ANM71987.1: Segmento 7 M1 H7N3 A/chicken/Puebla/CPA-04451-16-CENASA-95294/2016 | L M E |
| 53. ANM71957.1: Segmento 7 M1 H7N3 A/chicken/Jalisco/CPA-01859-16-CENASA-95294/2016 | L M E |
| 54. ACZ36791.1: Segmento 7 M1 H7N7 A/chicken/Brescia/1902 | L M E |
| 55. ABS89366.1: Segmento 7 M1 H7N7 A/chicken/Victoria/1976 | L M E |
| 56. ABI85048.1: Segmento 7 M1 H7N7 A/goose/Leipzig/187-7/1979 | L M E |
| 57. ABI85019.1: Segmento 7 M1 H7N7 A/chicken/Victoria/1985 | L M E |
| 58. AAR11373.1: Segmento 7 M1 H7N7 A/chicken/Netherlands/1/03 | L M E |
| 59. AMD38703.1: Segmento 7 M1 H7N8 A/turkey/Indiana/16-001403-1/2016 | L M E |
| 60. ARG44156.1: Segmento 7 M1 H7N9 A/chicken/Guangdong/GD15/2016 | L M E |
| 61. ARB51608.1: Segmento 7 M1 H7N9 A/chicken/Tennessee/17-007147-2/2017 | L M E |

43
↑

Figura 21: Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de la proteína M1 en el sitio 43 asociado al incremento de la virulencia. En la parte superior se localizan las secuencias de referencia de A / duck / Hokkaido / WZ83 / 2010 (H5N1) y A / duck / Hokkaido / WZ101 / 2010 (H5N1).

Análisis *in silico* de las mutaciones de alta patogenicidad descritas en los virus de influenza aviar
Sergio David Rodríguez Toledano

VI.III.IV. Proteína no estructural 1 (NS1)

Li Z. et al. (2006) compararon las cepas A / Goose / Guangdong / 1/96 y A / Goose / Guangdong / 2/96 (H5N1) con un IPIV de 2,1 y 0,0 respectivamente, teniendo el mismo PSC (PQRERRRKKR / GLF). Demostraron que un virus recombinante que expresa la proteína NS1 GS / GD / 1/96 con Ala149 puede antagonizar la inducción de los niveles de proteína de interferón en fibroblastos de embrión de pollo (CEF), pero un virus recombinante que lleva una sustitución Val149 no produce el mismo efecto. Estos resultados indican que el gen NS1 es crítico para la patogenicidad del virus de la influenza aviar en pollos y que el residuo de aminoácido Ala149 se correlaciona con la capacidad de estos virus para antagonizar la inducción de interferón en los CEF.⁶² Por lo anterior se analizaron las secuencias de NS1 de los VIAP con el objetivo de confirmar la presencia de 149A en los VIAAP, utilizando como referencias las cepas A / Goose / Guangdong / 1/96 y A / Goose / Guangdong / 2/96 por sus sitios 149A y 149V respectivamente.

➤ Mutación por sustitución V149A en la NS1

Las cincuenta y siete cepas (100 %) conservan Alanina en el sitio 149 y únicamente las cepas enlistadas del 2-13 por sus eliminaciones de aminoácidos, lo presentan en el sitio 147 y 144 (Figura 22). Lo anterior confirma que las cepas de AP tienen este aminoácido de forma conservada que es importante para la patogenicidad, pero es necesario tener estudios que respalden que las eliminaciones de aminoácidos y por lo cual la secuencia se desplaza no interfiere en la función de la mutación.

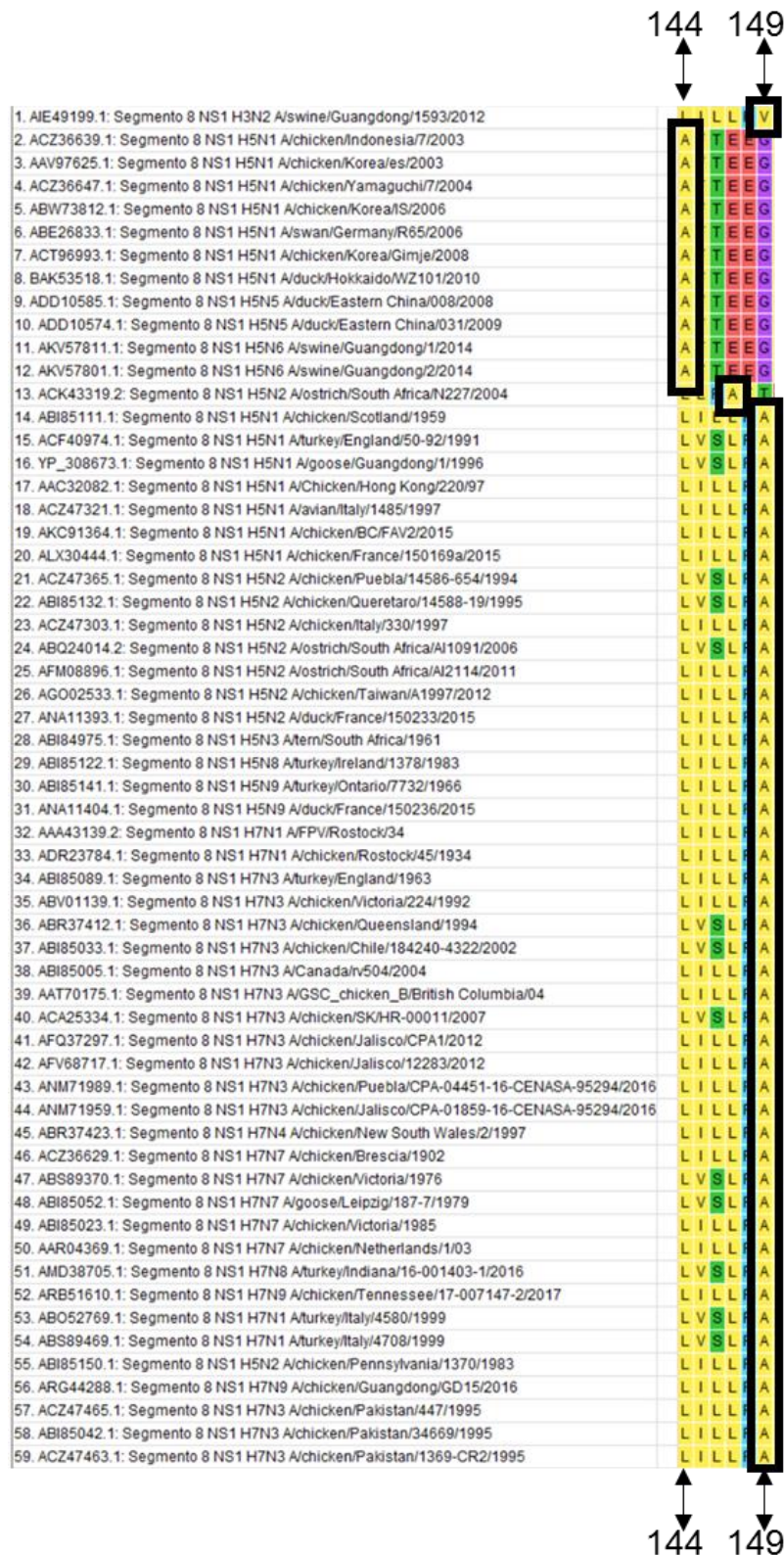


Figura 22: Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de la proteína NS1 en la posición 149 relacionada al aumento de la patogenicidad. Los virus de referencia A/swine/Guangdong/1593/2012 (H3N2) y A / Goose / Guangdong / 1/96 (H5N1) están enlistadas en los números 1 y 16 respectivamente. La secuencia de la proteína NS1 de A / Goose / Guangdong / 2/96 no se encontró disponible, por lo que se utilizó la secuencia de A/swine/Guangdong/1593/2012 (H3N2) que a pesar de ser un virus aislado del cerdo, presenta 149V en la proteína NS1 según lo especifica la base de datos de Influenza Research Database. Análisis *in silico* de las mutaciones de alta patogenicidad descritas en los virus de influenza aviar
Sergio David Rodríguez Toledano

Zhu Q. et al. (2008) al comparar las cepas A / swine / Fujian / 1/01 (H5N1) y A / swine / Fujian / 1/03 (H5N1) se percataron que diferían en el segmento 8, donde el segundo virus presentaba una eliminación de 15 nucleótidos (nt) en las posiciones de codificación 612 a 626. El aislado viral A / swine / Fujian / 1/01 (SW / FJ / 01) era altamente letal para los pollos, mientras que A / swine / Fujian / 1/03 (SW / FJ / 03) no era patógeno para pollos cuando se administró por vía intravenosa o intranasal. Para entender la base molecular de la diferencia en virulencia, utilizaron métodos de genética a la inversa para crear una serie de recombinantes de un solo gen de ambos virus. Se encontró que un virus recombinante que contenía el gen NS mutado del virus SW / FJ / 03 en el fondo del virus SW / FJ / 01 estaba completamente atenuado en pollos. También encontraron que los virus que expresaban la proteína NS1 mutante de SW / FJ / 03 no antagonizaban la inducción de la proteína de interferón (IFN). Por el contrario, solo el virus recombinante que contenía el gen NS de SW / FJ / 01 que es de tipo salvaje en el fondo SW / FJ / 03 era letal en pollos y antagonizaba los niveles de proteína IFN. Secuenciando la proteína que provenía de SW / FJ / 03, aseguraron que a causa de la pérdida de nt en el gen NS, la proteína NS1 suprime cinco aminoácidos en los sitios 191 a 195 ⁶³ Este caso de atenuación por una mutación de eliminación fue necesario analizarlo en nuestras secuencias NS1, esperando a que ninguna lo contenga dicha mutación, apoyándonos de la cepa A / swine / Fujian / 1/03 como cepa de referencia, ya que sin importar el huésped donde se aisló, presenta la eliminación en la región 191-195.

➤ Mutación por eliminación de los aminoácidos 191-195 en la NS1

Posterior al alineamiento se resaltó que la proteína NS1 de SW / FJ / 03 habría sufrido otra pérdida en su secuencia en los sitios 80-84 (Figura 23) siendo

este aspecto un punto a detallar más adelante. Efectivamente ninguna cepa de las cincuenta y siete presentó una supresión en las posiciones 191-195 que de manera original se encontrarían en los sitios 196-200 si tomamos en cuenta que el virus mostró una doble mutación por pérdida de aminoácidos en dos regiones diferentes. (Figura 23) Los resultados concuerdan con respecto al comportamiento de los VIAAP.



Figura 23: Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de la proteína NS1 en las regiones 78-92 y 191-200, donde la mutación por eliminación de los aminoácidos 196-200 está asociada a la atenuación de la virulencia. La secuencia de referencia de A / swine / Fujian / 1/03 (H5N1) se localiza en la parte superior. La secuencia de la proteína NS1 de A / swine / Fujian / 1/01 (H5N1) no se encontró disponible en el banco de genes.

Análisis *in silico* de las mutaciones de alta patogenicidad descritas en los virus de influenza aviar
Sergio David Rodríguez Toledano

Long J-X. et al.(2008) con el fin de investigar la importancia biológica de la única mutación por eliminación de 15 nucleótidos (nt) desde la posición 263 a 277 en el gen NS de virus H5N1 en los modelos de pollo y ratón, debido a que anteriormente Li K.S., et al. (2004) informaron que los virus H5N1 de todos los genotipos aislados en 2002 y a partir de entonces, excepto las cepas en los genotipos X0 - X3, tienen una pérdida de 15 nt desde la posición 263 a 277 en el gen NS1,⁶⁴ conduciendo a la supresión de 5 aminoácidos en los sitios 80 a 84 de la proteína NS1.⁶⁵ Se construyeron dos pares de virus recombinantes H5N1 que compartían siete genes y diferían de cada uno otro solo en el gen NS. Los virus recombinantes son: rWSN-SD portaba el gen NS de A/Duck/Shandong/093/2004 (H5N1) en su forma nativa sin eliminación, mientras que rWSN-mSD portaba el mismo gen NS pero con una pérdida artificial de 15 nt; rWSN-YZ portaba el gen NS de A/Duck/Yangzhou/232/2004 (H5N1) en su forma nativa con la supresión de 15 nt mientras que rWSN-mYZ portaba el mismo gen pero con una inserción mutada de 15 nt en la misma posición. Por comparación en pares, rWSN-mSD y rWSN-YZ tuvieron mayor IPIV en pollos que sus contrapartes rWSN-SD y rWSN-mYZ; además, rWSN-mSD y rWSN-YZ causaron más muertes y aumentaron la diseminación del virus desde el tracto respiratorio superior en pollos que rWSN-SD y rWSN-mYZ. Las secuencias de aminoácidos deducidas de las proteínas NS1 de estos cuatro mutantes indicaron que NS1 de rWSN-mSD y rWSN-YZ portaban 92E mientras que rWSN-SD y rWSN-mYZ portaban 92D. Por otro lado, el virus recombinante adicional rWSN-mSD-E92D que portaba la deleción 15-nt en el gen NS pero tenía la mutación E92D en la proteína NS1 mostró una atenuación significativa de la virulencia, en comparación con la de rWSN-mSD. Pareció que el efecto de aumento en la

virulencia por la eliminación de 15 nt en el gen NS se asoció con el cambio de D92E en la proteína NS1. Por lo tanto, los resultados en el presente estudio demostraron claramente que la eliminación de 15 nt desde la posición 263 a 277 en el gen NS asociado con el cambio D92E en la proteína NS1 de los virus H5N1 contribuye al aumento de la virulencia junto con la capacidad de replicación mejorada en pollos.⁶⁶ Se procedió al análisis de las secuencias de la NS1 y determinar la presencia de la mutación por la pérdida de aminoácidos en las proteínas a causa de una pérdida de nucleótidos en el segmento 8 de los virus, para ello se necesitó las secuencias de NS1 de las cepas A/Duck/Shandong/093/2004 y A/Duck/Yangzhou/232/2004 que servirán de guía.

➤ Mutación por eliminación de los aminoácidos 80-84 en la NS1

Al alinear las cincuenta y ocho secuencias de NS1, se destacó que cuarenta y seis cepas (79.31 %) no tienen una mutación por eliminación dentro de la región que menciona Li K.S., (2004). Por lo que se enfocó en las doce cepas (20.68 %) que sufrieron la pérdida de aminoácidos en la región blanco y que efectivamente fueron aisladas a partir del 2002 (Figura 24). La secuencia de A/ostrich/South Africa/N227/2004 es la única que cuenta con una pérdida de dos aminoácidos en los sitios 78-79, las otras 11 lo portan en las posiciones 80-84 siendo solo siete de ellas del subtipo H5N1 y las cuatro restantes del subtipo H5N5 y H5N6. (Figura 24)

➤ Mutación por eliminación de los aminoácidos 80-84 y mutación por sustitución D92E en la NS1

Tomando en cuenta el equilibrio entre la mutación por eliminación de aminoácidos y la mutación por sustitución D92E, las cepas del subtipo H5N6 A/swine/Guangdong/1/2014 y A/swine/Guangdong/2/2014 son las únicas que cumplen con lo estipulado en el trabajo de Long J-X (2008), mientras que las otras nueve a pesar de presentar la mutación por supresión no portan la mutación por sustitución D92E, lo cual es contradictorio en el mismo trabajo ya que los virus recombinantes que tenían esta última combinación presentaban una atenuación en la patogenicidad. ⁶⁶ (Figura 24)

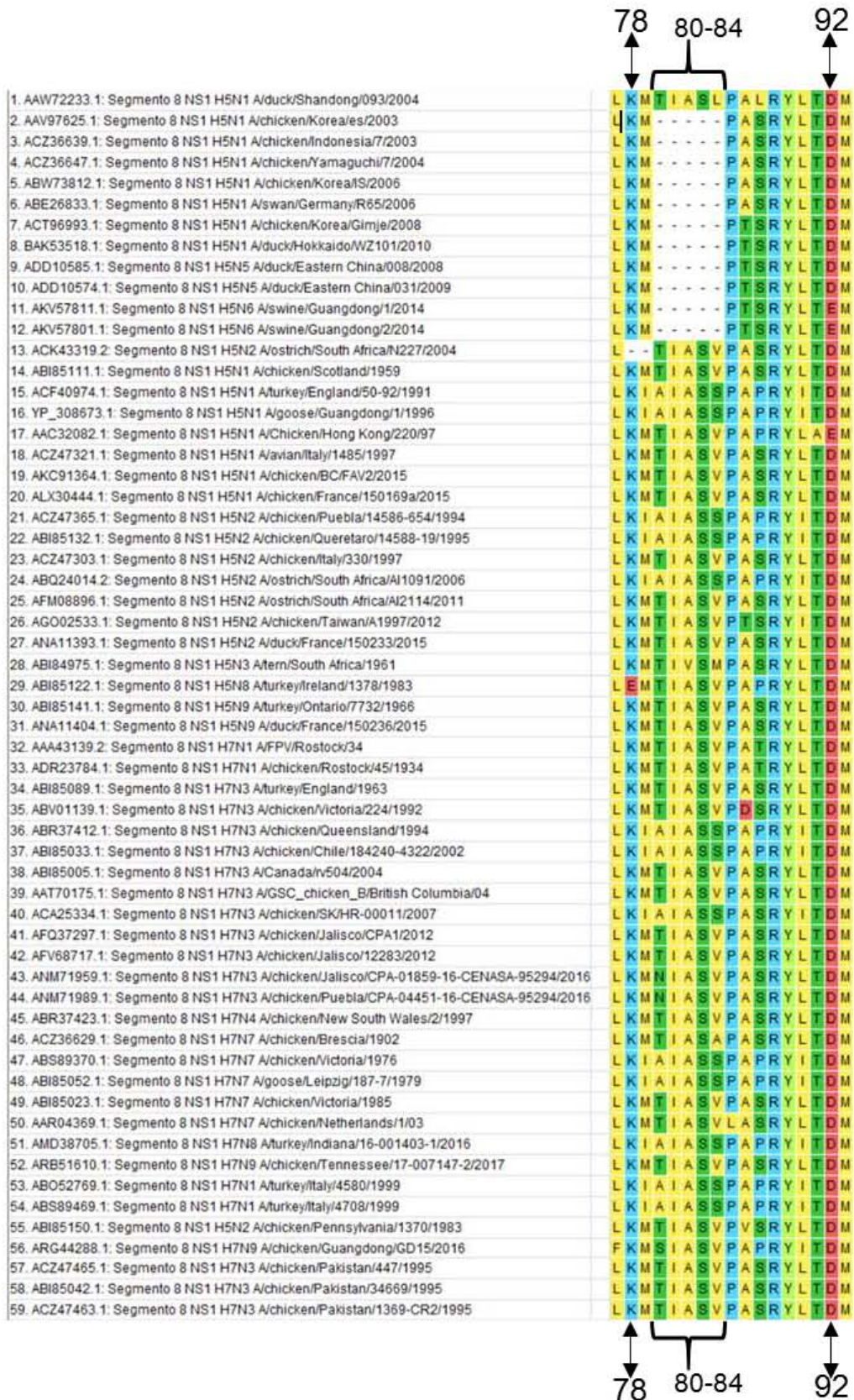


Figura 24: Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de la proteína NS1 en la región 78-92 relacionado a una patogenicidad de tipo consenso. La secuencia del virus de referencia A/Duck/Shandong/093/2004 (H5N1) se encuentra en la parte superior. La secuencia de la proteína NS1 de A/Duck/Yangzhou/232/2004 (H5N1) no se encontró disponible en el GenBank.

Análisis *in silico* de las mutaciones de alta patogenicidad descritas en los virus de influenza aviar
Sergio David Rodríguez Toledano

Cauthen A, et al (2007) al comparar experimentalmente subtipos de H7N3 que diferían en el tamaño de la proteína NS1 y en virulencia observaron que la variante que codifica la proteína NS1 truncada era un fuerte inductor de Interferón (IFN) que por su parte posteriormente producía un estado antiviral disminuyendo la patogenicidad en los pollos. Donde enfatizan que la capacidad de inducción de Interferón de los VIA parece ser un factor significativo en la regulación de la patogénesis, la virulencia y la transmisión viral de AIV en pollos. Sugiriendo que los fenotipos de VIA inductores de IFN deben considerarse al caracterizar las cepas del virus de la influenza aviar.⁶⁷ Años después Abdelwhab E. et al (2016) al percibir que en varios aislamientos virales en su extremo carboxilo terminal (ECT) de NS1 exhiben eliminaciones entre los aminoácidos 202 y 230 con un impacto aún muy incierto sobre la virulencia de estos VIA en pollos. Analizaron secuencias de proteínas NS1 de todos los subtipos de VIA en aves de 1902 a 2015 para estudiar la prevalencia y la distribución del truncamiento de ECT (Δ ECT). Observaron trece formas diferentes de Δ ECT en proteínas NS1 de 11 subtipos de HA y 8 de NA con altas prevalencias en los subtipos H9, H7, H6 y H10 y N9, N2, N6 y N1 particularmente en pollos y especies menores de aves de corral. Con un 88% de NS217 sin aminoácidos, 218-230 fue la forma de Δ ECT más común seguida de NS224 (3,6%). NS217 se encontró en 10 y 8 subtipos diferentes de HA y NA respectivamente, mientras que NS224 se detectó exclusivamente en los VIAAP H7N1 italianos, lo que sugiere relevancia para la virulencia. Para probar esta suposición, se utilizaron VIA de AP H7N1 para construir recombinantes resultando con tres formas, un VIAAP con la NS1 de tipo salvaje (Ap-NS224), un VIAAP con la NS1 con ECT prolongado (Ap-NS230) y un VIAAP con la NS1 de VIABP H7N1 (Ap-NSBp), y

se probaron *in vitro* e *in vivo*. La extensión de ECT en Ap NS1 disminuyó significativamente la replicación del virus en células de riñón de embrión de pollo. El truncamiento en el NS1 disminuyó el tropismo de Ap-NS224 hacia el endotelio, el sistema nervioso central y el epitelio del tracto respiratorio pero en general el estudio no obtuvo resultados significativos para confirmar que la mutación por eliminación de aminoácidos en el ECT está directamente relacionada con la naturaleza patógena de un virus VIA.⁶⁸ Se necesitó complementar el análisis de este trabajo, manejando las secuencias de NS1 con la finalidad de tener una idea más clara de la presencia del truncamiento en los VIAAP, puesto que solo se basaron en las cepas italianas del subtipo H7N1.

➤ Mutación por eliminación de los aminoácidos del extremo carboxilo terminal en la NS1

Cincuenta y un cepas de las cincuenta y ocho (87. 93 %) analizadas no presentan una pérdida de aminoácidos en la región del ECT, observando que el aislamiento viral más antiguo que porta la mutación por eliminación es de 1986 y el más reciente es del 2016. (Figura 25) Estos resultados pueden justificar que los virus con la mutación por supresión en el ECT necesitan de otros factores para incrementar su comportamiento patógeno así como su replicación en el huésped, porque con los resultados obtenidos por parte de Abdelwhab E. (2016) son contundentes para nuestra aseveración.



Figura 25: Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de la proteína NS1 en la región carboxilo terminal asociado a una variación en la virulencia.

Se procedió a sintetizar todas las mutaciones descritas para obtener un panorama con mayor precisión en cuanto a la forma de actuar de cada una en los virus de influenza aviar (Cuadro 1).

Análisis *in silico* de las mutaciones de alta patogenicidad descritas en los virus de influenza aviar
Sergio David Rodríguez Toledano

Cuadro 1: Mutaciones que modifican la patogenicidad de los virus de influenza aviar.

En las columnas se muestra: Las mutaciones junto con las proteínas implicadas, función de las mutaciones con base a los trabajos experimentales, referencias.

| Mutación | Función | Ref. |
|--|---|-------------|
| PB1 C38Y y PB1 A14V | -Se utilizaron virus de BP cuyas HA y NA fueron sustituidas por las de un virus de AP, previamente a las mutaciones por sustitución. -Al sustituir la C38Y en PB1, aumento tanto la actividad de la polimerasa en células DF-1 (una línea celular derivada de fibroblastos de pollo) in vitro como la patogenicidad en pollos (se acorto el tiempo medio de supervivencia de 3.39 dpi a 2.25 dpi). -Se sustituyó V14A en PB1, lo cual causo una reducción de la actividad de la polimerasa pero no afectó la patogenicidad en pollos. | 40 |
| PA L672F, HA 5 H308Q, HA 338+R, NP M374V, M1 D89N y R101K, M2 R45H | El virus recombinante de BP que portaba dos aminoácidos básicos extra en el SE, al presentar las 7 mutaciones, modificaba su patogenicidad igualándose a un virus de alta patogenicidad al inocularlo en pollos. | 41 |
| Supresión PA-X | La proteína PA-X actúa para disminuir la patogenicidad de un virus de AP en especies de aves al inhibir la replicación del virus y la respuesta. Por otra parte la pérdida de expresión de PA-X aumentaba la virulencia tanto en pollos como en ánades reales y mejoraba la actividad de la polimerasa y la replicación del virus tanto in vitro como in vivo. | 43 |
| HA T13K / desglicosilación del sitio 11 | Se garantizó que la mutación T13K en la HA de la cepa A / Chicken / Pennsylvania / 1/83 de BP condujo a la pérdida de un patrón de N-glicosilación en la asparagina ubicada en la posición 11, resultando en una mejora en la capacidad de escisión de PCS por furina-proteasas, y al probarlo experimentalmente se obtuvo mortalidad del 100% en los pollos. | 23 |
| HA 7 glicosilación en la posición 188 | Se observó que el virus con el sitio de glicosilación con una dosis letal media 50 (DLM50) de 105 daba como resultado la muerte de todos los pollos (8/8) en un tiempo de muerte promedio (TMP) de 2.3 días pi, en comparación con el virus que carecía del sitio de glicosilación y utilizando la misma dosis se obtuvo la muerte de 2/8 pollos en un TMP de 3.5 días pi. | 44 |
| HA 7 glicosilación en los sitios 123 y/o 149 / tallo corto de la NA | Se destacó que un virus que presenta una HA con glicosilación en la posición 123 y/o149 da un crecimiento eficiente cuando se combina con una NA de tallo corto. En otra cuestión se reduce la afinidad de HA por la unión al receptor y hacen que el virus sea menos dependiente de la función NA y a su vez menos sensibles a los fármacos inhibidores de NA. | 45 |
| HA 5 V346T/S | Tras el cambio de serina por valina se condujo a una supervivencia prolongada en menor grado en comparación con los animales infectados con un virus de AP con HA 346S, ya que no había diferencias significativas en la diseminación del virus o tropismo de órganos. | 49 |
| PB2 K123E, PB1 N16D, HA 7 E227G e I388T, M1 G228R y M2 L46P | El virus recombinante de BP que portaba dos aminoácidos básicos extra en el SE, al presentar las 6 mutaciones por sustitución demostraron ser los responsables de la muerte de todos los pollos (8/8) inoculados por vía intravenosa, resultando con IPIV de 2.21. Por consiguiente notaron que 227Glu y 388Ile de manera individual provocan la supervivencia de los pollos. | 50 |

| | | |
|--|--|-----------------|
| HA 7 A436T, Q450L y K536R | Se concluyó que la cepas italianas el virus de BP adquirió (i) el SE Polibásico, que era importante para facilitar la diseminación sistémica y aumentar la replicación, escisión y excreción; (ii) A436T, potenciando aún más el tropismo tisular; y (iii) K536R, que confiere estabilidad a HA. A partir de entonces, el virus adquirió Q450L, lo que resultó en una mayor virulencia y transmisión de ave a ave. | 51 |
| NP E184K y NS1 G148E | Existió la suficiente evidencia de que 184K de la proteína NP tenía el papel principal en la patogenicidad, matando a los 8 pollos en un TMP de 2 y que combinándolo con la sustitución 148E de la proteína NS1, causaba la misma mortalidad con un TMP de 1.87. | 53 |
| NP I109T | Se evidenció que un virus que provocaba un TMP de 4.0, cambio su TMP a 3 tras adquirir la mutación por sustitución. | 54 |
| NP M105V | Se confirmó que la diferencia que había entre dos virus de AP, respecto al tiempo de muerte promedio se le atribuía a esta mutación. | 39 |
| NP S50N y F98K | De manera sinérgica provocaron un IPIC de 1.55, aunque también causaron una leve elevación en el IPIC de forma individual (0.93 y 0.61 respectivamente). | 55 |
| NA eliminación de aminoácidos en el tallo | En distintos trabajos experimentales se demostró que la pérdida de aminoácidos en la región del tallo de la NA de aislados aviares mejora la replicación y patogenicidad en pollos, disminuyendo a su vez la replicación en patos pudiendo llegar a ser nula. | 56,57,6 9,70 |
| M1 T37A, R95K, S224N, K242N y M2 D21G | De forma sinérgica le conferían al virus una replicación mayor con un inicio más temprano en su liberación, inflamación pulmonar más severa, con neumonía intersticial y bronconeumonía, desprendimiento del revestimiento epitelial mucoso, una propagación extra pulmonar, observando también congestión renal. | 60 |
| M1 I43M | La diferencia en la patogenicidad entre dos VIAAP utilizados se determinó solo por un único aminoácido en la proteína M1 el cual fue metionina en la posición 43. | 61 |
| NS1 V149A | Demostraron que un virus recombinante que expresa la proteína NS1 con Ala149 puede antagonizar la inducción de los niveles de proteína de interferón en fibroblastos de embrión de pollo (CEF), pero un virus recombinante que lleva una sustitución Val149 no produce el mismo efecto. | 62 |
| NS1 eliminación de los aminoácidos de las posiciones 191-195 | Comprobaron que al perder cinco aminoácidos en los sitios 191 a 195 en la NS1 causa atenuación en un VIAAP. | 63 |
| NS1 eliminación de los aminoácidos de los sitios 80-84 / D92E | Se destacó que la eliminación de 15 nt desde la posición 263 a 277 en el gen NS asociado con el cambio D92E en la proteína NS1 de los virus H5N1 contribuye al aumento de la virulencia junto con la capacidad de replicación mejorada en pollos. | 66 |
| NS1 eliminación de los aminoácidos del extremo carboxilo terminal | Hay poca precisión con la función de la mutación por eliminación de la región del carboxilo terminal de la NS1. Por lo que depende en mayor parte a una función sinérgica con otros genes que se desconocen. | 68 |

De las 41 mutaciones recabadas solo 39 desmostaron ser claras en el aumento de la patogenicidad en el virus de la influenza aviar exceptuando a la mutación por eliminación de aminoácidos en el carboxilo terminal de NS1 por la falta de exactitud en su papel en la patogenicidad ⁶⁸ y también la mutación por pérdida de aminoácidos en los sitios 191-200 ya que se refiere a la atenuación y no al incremento de la virulencia ⁶³.

De las 39 mutaciones, se descartaron 3 por las siguientes razones: 1. mutación por supresión de la proteína PA-X ya que la disponibilidad de la proteína es incierta ⁴³; 2. mutación por inserción de arginina en la posición 338 en la proteína HA de tipo H5 debido a que dicha región es parte del sitio de escisión y la aparición de aminoácidos básicos (ver Anexo V) en el ya son parte del diagnóstico independientemente del tipo de mutación por el cual se originan (sustitución, inserción, recombinación)⁴¹; 3. mutación por sustitución S50N en la proteína M1 ante la incongruencia de las cepas de referencia y lo obtenido por los autores⁵⁵. De esta manera se prosiguió a sintetizar la información que engloba a las 60 cepas con respecto a las 36 mutaciones (Cuadro 2). Posteriormente se calculó el promedio de mutaciones por cepa.

Para los subtipos H5 el total de mutaciones que les compete es de 28 (Cuadro 3) y los subtipos H7 son 33 (Cuadro 4) por cuestiones del tipo de la hemoaglutinina y mutaciones propias de cada una.

Cuadro 2: Mutaciones presentes en cada uno de los aislados virales de influenza aviar de alta patogenicidad.

En las columnas se muestra: La identificación numérica de la cepa viral, mutaciones presentes en la PB2, mutaciones presentes en la PB1, mutaciones presentes en la PA, mutaciones presentes en la HA de subtipo H5 y H7, mutaciones presentes en la NP, mutaciones presentes en la M2, mutaciones presentes en la M1, mutaciones presentes en la HA de subtipo H5 y H7, mutaciones presentes en la NS1, total de mutaciones presentes en cada cepa NA, mutaciones presentes en la M1, mutaciones presentes en la M2, mutaciones presentes en la NS1, total de mutaciones presentes de cada cepa viral y la identificación numérica de la cepa viral. Los subtipos H5 abarcan los primeros 32 filas y las 28 restantes por el subtipo H7. 1: mutación presente, 1*: mutación presente pero en una posición diferente a causa de una eliminación de uno o varios aminoácidos, Zona en blanco: mutación ausente, NA: mutación que no se puede demostrar su presencia por la falta de la secuencia proteica total o parcial. TCNA: tallo corto de la NA, Del/92: eliminación de aminoácidos con mutación por sustitución en el sitio 92.

| PROTEÍNA MUTACIONES | PB2 | | PB1 | | PA | | HA5 | | HA7 | | NP | | M1 | | M2 | | NS1 | | Total |
|------------------------|------|-----|------|------|------|------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | K23E | A4V | N40D | C37Y | I67P | T10K | Y497F | Y497F | Y497F | Y497F | Y497F | Y497F | Y497F | Y497F | Y497F | Y497F | Y497F | Y497F | |
| 1 | 1 | | | | | | | | | | | | | | | | | | 1 |
| 2 | 1 | | | | | | | | | | | | | | | | | | 1 |
| 3 | 1 | | | | | | | | | | | | | | | | | | 1 |
| 4 | 1 | | | | | | | | | | | | | | | | | | 1 |
| 5 | 1 | | | | | | | | | | | | | | | | | | 1 |
| 6 | 1 | | | | | | | | | | | | | | | | | | 1 |
| 7 | 1 | | | | | | | | | | | | | | | | | | 1 |
| 8 | 1 | | | | | | | | | | | | | | | | | | 1 |
| 9 | 1 | | | | | | | | | | | | | | | | | | 1 |
| 10 | 1 | | | | | | | | | | | | | | | | | | 1 |
| 11 | 1 | | | | | | | | | | | | | | | | | | 1 |
| 12 | 1 | | | | | | | | | | | | | | | | | | 1 |
| 13 | 1 | | | | | | | | | | | | | | | | | | 1 |
| 14 | 1 | | | | | | | | | | | | | | | | | | 1 |
| 15 | 1 | | | | | | | | | | | | | | | | | | 1 |
| 16 | 1 | | | | | | | | | | | | | | | | | | 1 |
| 17 | 1 | | | | | | | | | | | | | | | | | | 1 |
| 18 | 1 | | | | | | | | | | | | | | | | | | 1 |
| 19 | 1 | | | | | | | | | | | | | | | | | | 1 |
| 20 | 1 | | | | | | | | | | | | | | | | | | 1 |
| 21 | 1 | | | | | | | | | | | | | | | | | | 1 |
| 22 | 1 | | | | | | | | | | | | | | | | | | 1 |
| 23 | 1 | | | | | | | | | | | | | | | | | | 1 |
| 24 | 1 | | | | | | | | | | | | | | | | | | 1 |
| 25 | 1 | | | | | | | | | | | | | | | | | | 1 |
| 26 | 1 | | | | | | | | | | | | | | | | | | 1 |
| 27 | 1 | | | | | | | | | | | | | | | | | | 1 |
| 28 | 1 | | | | | | | | | | | | | | | | | | 1 |
| 29 | 1 | | | | | | | | | | | | | | | | | | 1 |
| 30 | 1 | | | | | | | | | | | | | | | | | | 1 |
| 31 | 1 | | | | | | | | | | | | | | | | | | 1 |
| 32 | 1 | | | | | | | | | | | | | | | | | | 1 |
| 33 | 1 | | | | | | | | | | | | | | | | | | 1 |
| 34 | 1 | | | | | | | | | | | | | | | | | | 1 |
| 35 | 1 | | | | | | | | | | | | | | | | | | 1 |
| 36 | 1 | | | | | | | | | | | | | | | | | | 1 |
| 37 | 1 | | | | | | | | | | | | | | | | | | 1 |
| 38 | 1 | | | | | | | | | | | | | | | | | | 1 |
| 39 | 1 | | | | | | | | | | | | | | | | | | 1 |
| 40 | 1 | | | | | | | | | | | | | | | | | | 1 |
| 41 | 1 | | | | | | | | | | | | | | | | | | 1 |
| 42 | 1 | | | | | | | | | | | | | | | | | | 1 |
| 43 | 1 | | | | | | | | | | | | | | | | | | 1 |
| 44 | 1 | | | | | | | | | | | | | | | | | | 1 |
| 45 | 1 | | | | | | | | | | | | | | | | | | 1 |
| 46 | 1 | | | | | | | | | | | | | | | | | | 1 |
| 47 | 1 | | | | | | | | | | | | | | | | | | 1 |
| 48 | 1 | | | | | | | | | | | | | | | | | | 1 |
| 49 | 1 | | | | | | | | | | | | | | | | | | 1 |
| 50 | 1 | | | | | | | | | | | | | | | | | | 1 |
| 51 | 1 | | | | | | | | | | | | | | | | | | 1 |
| 52 | 1 | | | | | | | | | | | | | | | | | | 1 |
| 53 | 1 | | | | | | | | | | | | | | | | | | 1 |
| 54 | 1 | | | | | | | | | | | | | | | | | | 1 |
| 55 | 1 | | | | | | | | | | | | | | | | | | 1 |
| 56 | 1 | | | | | | | | | | | | | | | | | | 1 |
| 57 | 1 | | | | | | | | | | | | | | | | | | 1 |
| 58 | 1 | | | | | | | | | | | | | | | | | | 1 |
| 59 | 1 | | | | | | | | | | | | | | | | | | 1 |
| 60 | 1 | | | | | | | | | | | | | | | | | | 1 |

Cuadro 3. Número de mutaciones presentes en las 32 cepas del subtipo H5 con los respectivos porcentajes. En las columnas se muestra: el nombre de las cepas junto con su identificación numérica, la disponibilidad total o parcial de las secuencias proteicas, la cantidad de mutaciones que presenta, el porcentaje de mutaciones en relación al total de mutaciones del subtipo H5. La zona sombreada de verde representa a los virus con secuencias completas.

| Clave.-Cepa (subtipo) | Secuencias completas | No. de mutaciones | % de mutaciones (28=100%) |
|--|----------------------|-------------------|---------------------------|
| 1.- A/chicken/Scotland/1959 (H5N1) | D | 9 | 32.1428571 |
| 2.- A/turkey/England/50-92/1991 (H5N1) | D | 6 | 21.4285714 |
| 3.- A/goose/Guangdong/1/1996 (H5N1) | D | 8 | 28.5714286 |
| 4.- A/avian/Italy/1485/1997 (H5N1) | ND | 5 | 17.8571429 |
| 5.- A/Chicken/Hong Kong/220/97 (H5N1) | ND | 10 | 35.7142857 |
| 6.- A/chicken/Korea/es/2003 (H5N1) | D | 11 | 39.2857143 |
| 7.- A/chicken/Indonesia/7/2003 (H5N1) | D | 12 | 42.8571429 |
| 8.- A/chicken/Yamaguchi/7/2004 (H5N1) | D | 12 | 42.8571429 |
| 9.- A/chicken/Korea/IS/2006 (H5N1) | ND | 9 | 32.1428571 |
| 10.- A/swan/Germany/R65/2006 (H5N1) | ND | 12 | 42.8571429 |
| 11.- A/chicken/Korea/Gimje/2008 (H5N1) | ND | 7 | 25 |
| 12.- A/duck/Hokkaido/WZ101/2010 (H5N1) | D | 12 | 42.8571429 |
| 13.- A/chicken/BC/FAV2/2015 (H5N1) | D | 12 | 42.8571429 |
| 14.- A/chicken/France/150169a/2015 (H5N1) | D | 7 | 25 |
| 15.- A/chicken/Pennsylvania/1370/1983 (H5N2) | D | 9 | 32.1428571 |
| 16.- A/chicken/Puebla/8623-607/1994 (H5N2) | ND | 4 | 14.2857143 |
| 17.- A/chicken/Puebla/14586-654/1994 (H5N2) | ND | 7 | 25 |
| 18.- A/chicken/Queretaro/14588-19/1995 (H5N2) | D | 7 | 25 |
| 19.- A/chicken/Italy/330/1997 (H5N2) | D | 6 | 21.4285714 |
| 20.- A/ostrich/South Africa/N227/2004 (H5N2) | D | 9 | 32.1428571 |
| 21.- A/ostrich/South Africa/AI1091/2006 (H5N2) | ND | 5 | 17.8571429 |
| 22.- A/ostrich/South Africa/AI2114/2011 (H5N2) | D | 8 | 28.5714286 |
| 23.- A/chicken/Taiwan/A1997/2012 (H5N2) | D | 10 | 35.7142857 |
| 24.- A/duck/France/150233/2015 (H5N2) | D | 6 | 21.4285714 |
| 25.- A/tern/South Africa/1961 (H5N3) | D | 8 | 28.5714286 |
| 26.- A/duck/Eastern China/008/2008 (H5N5) | D | 10 | 35.7142857 |
| 27.- A/duck/Eastern China/031/2009 (H5N5) | D | 11 | 39.2857143 |
| 28.- A/swine/Guangdong/1/2014 (H5N6) | D | 13 | 46.4285714 |
| 29.- A/swine/Guangdong/2/2014 (H5N6) | D | 13 | 46.4285714 |
| 30.- A/turkey/Ireland/1378/1983 (H5N8) | D | 7 | 25 |
| 31.- A/turkey/Ontario/7732/1966 (H5N9) | ND | 6 | 21.4285714 |
| 32.- A/duck/France/150236/2015 (H5N9) | D | 6 | 21.4285714 |

*D: Virus con todas las secuencias proteicas completas y disponibles en el banco de genes (omitiendo PB1-F2 y PA-X).

*ND: Virus donde algunas de sus secuencias proteicas se encuentran incompletas o ausentes en banco de genes.

Cuadro 4. Número de mutaciones presentes en las 28 cepas del subtipo H7 con los respectivos porcentajes. En las columnas se muestra: el nombre de las cepas junto con su identificación numérica, la disponibilidad total o parcial de las secuencias proteicas, la cantidad de mutaciones que presenta, el porcentaje de mutaciones en relación al total de mutaciones del subtipo H7. La zona sombreada de verde representa a los virus con secuencias completas.

| Clave.-Cepa (subtipo) | Secuencias completas | No. de mutaciones | % de mutaciones (33=100%) |
|--|----------------------|-------------------|---------------------------|
| 33.- A/FPV/Rostock/34 (H7N1) | ND | 12 | 36.3636364 |
| 34.- A/chicken/Rostock/45/1934 (H7N1) | D | 12 | 36.3636364 |
| 35.- A/turkey/Italy/4580/1999 (H7N1) | D | 11 | 33.3333333 |
| 36.- A/turkey/Italy/4708/1999 (H7N1) | D | 11 | 33.3333333 |
| 37.- A/turkey/England/1963 (H7N3) | D | 10 | 30.3030303 |
| 38.- A/chicken/Victoria/224/1992 (H7N3) | D | 8 | 24.2424242 |
| 39.- A/chicken/Queensland/1994 (H7N3) | D | 7 | 21.2121212 |
| 40.- A/chicken/Pakistan/447/1995 (H7N3) | ND | 7 | 21.2121212 |
| 41.- A/chicken/Pakistan/34669/1995 (H7N3) | D | 9 | 27.2727273 |
| 42.- A/chicken/Pakistan/1369-CR2/1995 (H7N3) | ND | 6 | 18.1818182 |
| 43.- A/chicken/Chile/4957/02 (H7N3) | ND | 4 | 12.1212121 |
| 44.- A/chicken/Chile/184240-4322/2002 (H7N3) | ND | 6 | 18.1818182 |
| 45.- A/Canada/rv504/2004 (H7N3) | D | 9 | 27.2727273 |
| 46.- A/GSC_chicken_B/British Columbia/04 (H7N3) | D | 9 | 27.2727273 |
| 47.- A/chicken/SK/HR-00011/2007 (H7N3) | D | 7 | 21.2121212 |
| 48.- A/chicken/Jalisco/CPA1/2012 (H7N3) | D | 8 | 24.2424242 |
| 49.- A/chicken/Jalisco/12283/2012 (H7N3) | ND | 9 | 27.2727273 |
| 50.- A/chicken/Jalisco/CPA-01859-16-CENASA-95294/2016 (H7N3) | D | 9 | 27.2727273 |
| 51.- A/chicken/Puebla/CPA-04451-16-CENASA-95294/2016 (H7N3) | D | 10 | 30.3030303 |
| 52.- A/chicken/New South Wales/2/1997 (H7N4) | D | 8 | 24.2424242 |
| 53.- A/chicken/Brescia/1902 (H7N7) | D | 10 | 30.3030303 |
| 54.- A/chicken/Victoria/1976 (H7N7) | D | 8 | 24.2424242 |
| 55.- A/goose/Leipzig/187-7/1979 (H7N7) | D | 9 | 27.2727273 |
| 56.- A/chicken/Victoria/1985 (H7N7) | ND | 7 | 21.2121212 |
| 57.- A/chicken/Netherlands/1/03 (H7N7) | ND | 7 | 21.2121212 |
| 58.- A/turkey/Indiana/16-001403-1/2016 (H7N8) | D | 7 | 21.2121212 |
| 59.- A/chicken/Guangdong/GD15/2016 (H7N9) | D | 17 | 51.5151515 |
| 60.- A/chicken/Tennessee/17-007147-2/2017 (H7N9) | D | 8 | 24.2424242 |

*D: Virus con todas las secuencias proteicas completas y disponibles en el banco de genes (omitiendo PB1-F2 y PA-X).

*ND: Virus donde algunas de sus secuencias proteicas se encuentran incompletas o ausentes en banco de genes.

De los 60 virus obtenidos solo se ocuparan 43, con el fin de calcular con mayor exactitud el número de mutaciones que presenta cada uno ya que 17 aislados virales presentaron algunas secuencias importantes de forma parcial o no están disponibles en el GenBank, por lo que al final se contó con 23 subtipos de H5 (Cuadro 3) y 20 subtipos de H7 (Cuadro 4).

➤ Mutaciones totales asociadas al incremento de la patogenicidad en los aislados virales

Los aislados del subtipo H5: A/turkey/England/50-92/1991 (H5N1); A/chicken/Italy/330/1997 (H5N2); A/duck/France/150233/2015 (H5N2); A/duck/France/150236/2015 (H5N9), presentaron 6 mutaciones de las 28 (21.428 %) siendo este resultado el más bajo, mientras que las cepas A/swine/Guangdong/1/2014 (H5N6) A/swine/Guangdong/2/2014 (H5N6) portan el número más alto que fue de 13 mutaciones (46.428 %) (Cuadro 3 y Figura 26). De la misma forma en el subtipo H7: A/chicken/Queensland/1994 (H7N3); A/chicken/SK/HR-00011/2007 (H7N3) y A/turkey/Indiana/16-001403-1/2016 (H7N8) resultaron con 7 mutaciones de 33 (21.21 %) mientras que A/chicken/Guangdong/GD15/2016 contiene 17 mutaciones (51.51 %) (Cuadro 4 y Figura 27).

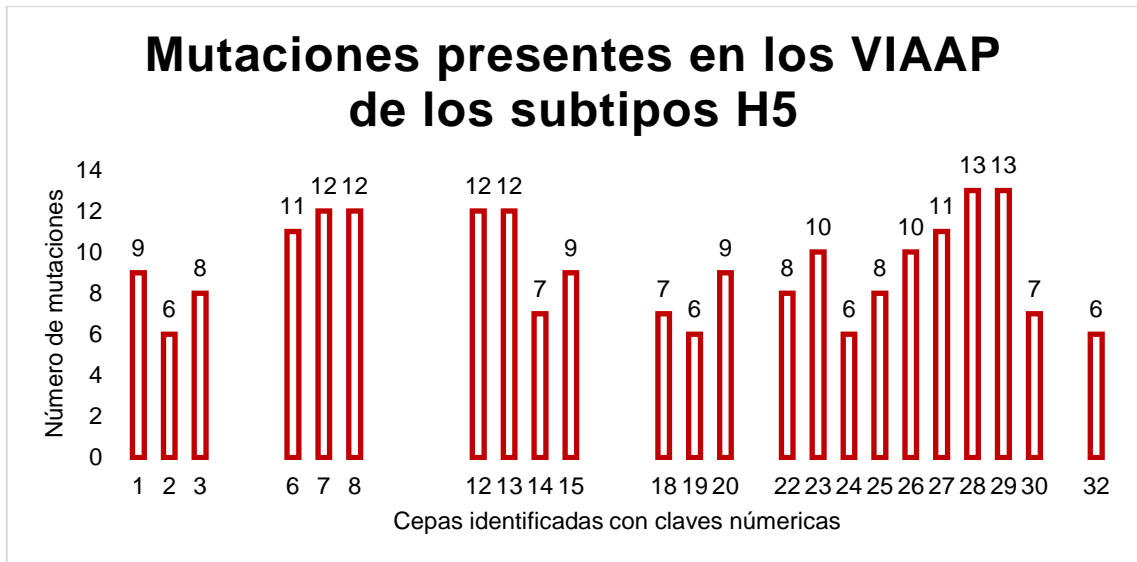


Figura 26: Número de mutaciones presentes en los aislados virales del subtipo H5 que presentaron secuencias proteicas disponibles y completas. Las cepas son identificadas mediante claves numéricas. Los espacios vacíos representan a los aislados virales con secuencias proteicas no disponibles en el banco de genes o las presentaron de forma parcial.

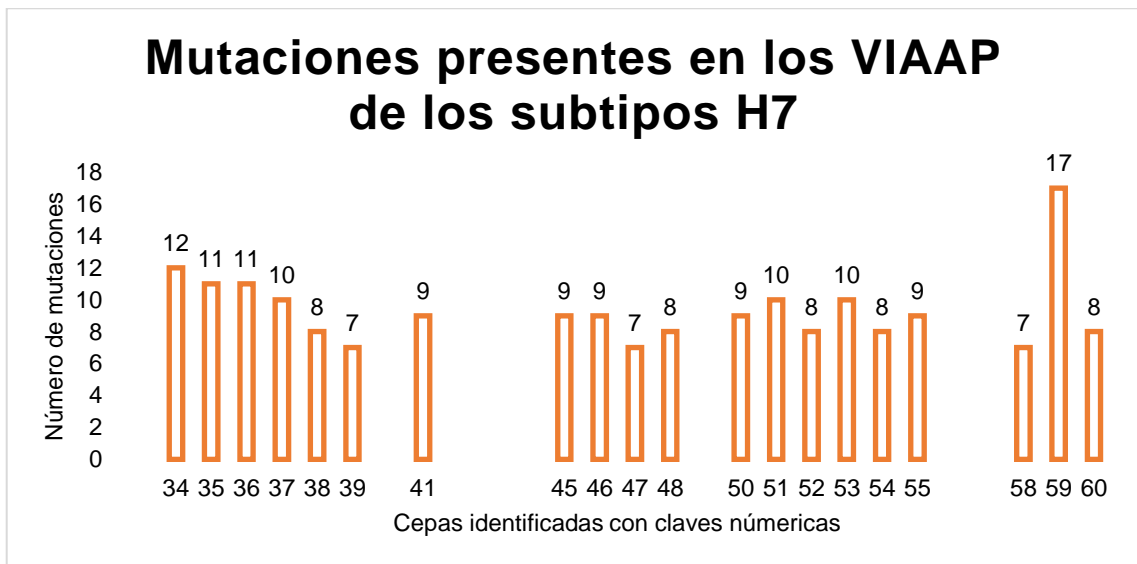


Figura 27: Número de mutaciones presentes en los aislados virales del subtipo H7 que presentaron secuencias proteicas disponibles y completas. Las cepas son identificadas mediante claves numéricas. Los espacios vacíos representan a los aislados virales con secuencias proteicas no disponibles en el banco de genes o las presentaron de forma parcial.

Para verificar el impacto que producen los resultados anteriores respecto a virus con menos mutaciones en comparación con los virus que contienen más se recurrieron a dos parámetros de patogenicidad utilizados actualmente en el diagnóstico que son el IPIV y el número de aminoácidos básicos en el sitio de escisión (SE). La cepa A/chicken/Queensland/1994 (H7N3) no está el dato de IPIV pero sustenta 4 aminoácidos básicos en el SE, A/turkey/England/50-92/1991 (H5N1) tiene un IPIV de 3.00 y 5 aminoácidos en el SE, A/chicken/Italy/330/1997 (H5N1) genera un IPIV de 2.98 y tiene 6 aminoácidos básicos en el SE, A/duck/France/150233/2015 (H5N2) no está disponible el IPIV pero porta 4 aminoácidos básicos,^{31,32} A/swine/Guangdong/1/2014 (H5N6) y A/swine/Guangdong/2/2014 (H5N6) provocan un IPIV de 2.8 y 2.99 respectivamente y contienen 6 aminoácidos básicos en el SE,⁵⁹ A/chicken/SK/HR-00011/2007 (H7N3) demuestra un IPIV de 3 y alberga 5 aminoácidos básicos en el SE, A/turkey/Indiana/16-001403-1/2016 (H7N8) no tiene evidencia del IPIV pero el SE cuenta con 6 aminoácidos básicos, A/chicken/Guangdong/GD15/2016 (H7N9) arroja un IPIV de 3 y el SE concentra 6 aminoácidos básicos^{31,32}.

VII. DISCUSIÓN

La técnica de la genética inversa es una herramienta muy útil para explorar la función biológica de un gen individual mediante la fabricación de varios virus recombinantes que difieren entre sí solo en el gen particular investigado ⁷¹. Con el fin de investigar la importancia de las mutaciones expuestas por los trabajos experimentales que se citaron y por consiguiente se analizaron con los virus de influenza aviar de alta patogenicidad, se demostró en primera instancia que los cambios moleculares que aparecen en las secuencias proteicas de una cepa y por los cuales se puede aumentar o atenuar la patogenicidad de la misma varían en prevalencia entre cada virus; y que al mismo tiempo la cantidad de mutaciones no refleja necesariamente un fenotipo más virulento o menos virulento.

Para ser más preciso se observó que las cepas con mayor prevalencia de mutaciones fueron A/swine/Guangdong/1/2014 (H5N6), A/swine/Guangdong/1/2014 (H5N6) y A/chicken/Guangdong/GD15/2016 (H7N9). Destacando de manera global que las secuencias proteicas que presentaron gran número de mutaciones fueron en mayor medida provenientes de aislamientos virales que se obtuvieron de zonas asiáticas y en forma correspondiente la gran mayoría de cepas de referencia que se utilizaron en los trabajos experimentales anteriormente citados son provenientes de la misma región. Por ello es imprescindible mencionar que los virus que se presentan en un área determinada son más fácil que compartan mayor similitud en estructura independientemente del subtipo debido a la recombinación que existe y su facilidad de compartir uno o más segmentos.

En un estudio desarrollado por Pu J, et al. (2015) aseguran que las cepas del virus H9N2 ha circulado en granjas avícolas durante más de una década, demostrando que los virus H9N2 de genotipo G57 se han vuelto predominantes en pollos desde 2010 en China por su mayor adaptabilidad y mejor capacidad de escapar del sistema inmune, causando brotes nacionales en parvadas de pollos durante 2010-2013. La mayor prevalencia de virus H9N2 en pollos ha contribuido directamente a la aparición en humanos de H7N9 y otros nuevos recombinantes con segmentos similares a H9N2 ⁷². Siguiendo con las investigaciones Pu J, et al. (2017) confirmaron que la proteína M1 y M2 del subtipo H9N2 procedente del genotipo G57 portan mutaciones por sustituciones causantes de un fenotipo más virulento ⁶⁰. Distinguiendo así durante la alineación del presente análisis que las secuencias de A/chicken/Guangdong/GD15/2016 (H7N9) contenían todas las mutaciones por sustitución apoyando a la aseveración anteriormente planteada.

Cabe destacar que cuatro mutaciones por sustitución resultaron ser constantes en todas las secuencias virales y en conjunto con un sitio de escisión polibásico en la HA logran aumentar aún más la virulencia del agente causante de la influenza aviar: 1. Mutación por sustitución C38Y en la PB1 produjo una muerte más aguda en pollos ⁴⁰; 2. Mutación por sustitución E184K en la NP hizo que el virus disminuyera 4.1 días el TMP en pollos ^{52,53}; 3. Mutación por sustitución I43M en la proteína M1 demostró un fenotipo más patógeno tanto en pollos como en patos ⁶¹; 4. Mutación por sustitución V149A en la proteína NS1 logró convertir a un virus con IPIV de 0.0 a un virus con IPIV 2.1 y en fibroblastos de embrión de pollo pudo antagonizar la inducción de los niveles de proteína de interferón ⁶².

Por otro lado tres mutaciones por sustitución demostraron ser las responsables en la atenuación de un virus sin importar que este porte un punto de corte polifásico y al mismo tiempo altamente patógeno en pollos: 1. Las mutaciones por sustitución G227E y T388I en la HA actuado de manera separada en el mismo virus de subtipo H7N7 provocaron un IPIV de 0.0 y 0.15 respectivamente cuando en un inicio era de 2.21⁵⁰; 2. Mutación por eliminación de los sitios 196-200 en la proteína NS1 produjo un IPIV de 0.2 en un virus de subtipo H5N1 que originalmente producía un IPIV de 2.5. ⁶³

Adicionalmente a esta última mutación, se puede inferir que los cambios moleculares que ocurren en ciertos puntos o regiones de la proteína NS1 llegan a ser críticos en la virulencia de un virus que originalmente es de alta patogenicidad como puede ser la sustitución A149V, la sustitución E92D o la eliminación de aminoácidos en el carboxilo terminal. Que al mismo tiempo demuestran tener una relación directa con el IFN tipo 1 y sus efectos antivirales ^{62,63,66,67,73}.

En el análisis de la HA, los sitios de corte de todos los VIAAP corresponden al descrito para los virus de Alta Patogenicidad debido a que cumplen con los criterios establecidos por la OIE, los cuales califican a un virus de alta patogenicidad como aquellos de subtipos H5 y H7 que tengan un índice de patogenicidad intravenoso mayor a 1.2, o bien que causen al menos el 75% de mortalidad en pollos de 4 a 8 semanas y que el segmento de la Hemoaglutinina tenga el potencial para consolidar un sitio de escisión polibásico. A pesar de que no todos los virus tengan un índice de patogenicidad intravenoso reportado, se

puede basar en la información de acuerdo al impacto que causaron en la industria avícola cuyos parámetros de morbilidad y mortalidad son los que evalúan también el nivel de la virulencia siendo parte esencial para el llenado de los informes obligatorios. Por lo que la presencia de aminoácidos básicos en el punto de corte de la HA adicionados por mutaciones de diferente índole (sustitución, inserción o recombinación) son la base para originar un agente viral de tipo emergente.

Aunque se necesita de más cambios moleculares que acompañen al sitio de corte polibásico para incrementar la virulencia, poniendo como ejemplo los casos de *A/chicken/Pennsylvania/1/83* (H5N2), *A/goose/Guandong/2/96* (H5N1), *A/turkey/England/87-92BFC/91* (H5N1) y *A/chicken/Texas/298313/04* (H5N2), los cuales genéticamente codifican para virus de IAAP basándose en un sitio de escisión polibásico pero que a pesar de esta propiedad no logran cumplir con el requisito del IPIV dictado por la OIE ^{2,17}, sólo se han identificado los dos mecanismos que previenen la expresión de este potencial en los aislamientos *A/chicken/Pennsylvania/1/83* (H5N2) y *A/goose/Guandong/2/96* (H5N1),^{23,62} pero que ninguno de ellos puede aplicarse a los aislamientos *A/turkey/England/87-92BFC/91* (H5N1) o *A/chicken/Texas/298313/04* (H5N2),^{74,75} estos acontecimientos fueron en parte la razón para proceder a la realización del presente análisis para encontrar los eventos puntuales que de por medio conforman la virulencia en los VIAAP para las aves de corral.

Actualmente cuando se estudia un virus de influenza aviar no solo se verifica la estructura de la proteína HA, también la proteína sintetizada por el segmento seis es de primordial interés, donde se da por hecho que la mutación por eliminación de una cierta cantidad de aminoácidos en el tallo de la neuraminidasa es indispensable para lograr que un virus de influenza aviar se adapte a aves de corral. Este marcador de adaptación se ha sustentado en parte a los trabajos experimentales como los realizados por Munier S, et al. (2010), Sorrell EM, et al. (2010), Hoffmann TW, et al. (2012) y Stech O, et al. (2015), ya que demostraron que la pérdida de aminoácidos en la región del tallo de la NA de aislados aviares mejora la replicación y patogenicidad en pollos, disminuyendo a su vez la replicación en patos pudiendo llegar a ser nula.^{56,57,69,70} Cuyos resultados se complementan con el extenso análisis de Li J, et al. (2011) en el cual observaron que la mayor cantidad de virus con esta mutación por eliminación provienen de huéspedes principalmente del orden *Galliformes*, mientras que en menor cantidad provienen de huéspedes que en su mayoría son del orden *Anseriformes* y *Charadriiformes*.⁴⁸ No obstante en el presente estudio se confirma que la presencia de la mutación por eliminación de aminoácidos en la región del tallo no determina directamente la patogenicidad de los virus en pollos, puesto que un virus de influenza aviar puede replicarse, enfermar y matar ya sea a una pequeña o gran cantidad de aves de corral sin hacer uso previo de este marcador de adaptación.

Con respecto a estos sucesos es importante mencionar que la cualidad patogénica es poligénica ^{27,28}, donde se existe un sinergismo proteico, es decir, las mutaciones que ocurren en los genes que a su vez producen las proteínas virales se pueden combinar con otras para expresar una mayor virulencia y en la manera contraria también se pueden inhibir, tal es el caso del equilibrio entre la HA-NA donde la presencia de ciertos puntos de glicosilación en la HA obtenidos a partir de mutaciones por sustitución a base de asparagina próximos al sitio de escisión se tienen que combinar con una neuraminidasa que haya sufrido la mutación por eliminación de aminoácidos en el tallo, consiguiendo menor afinidad al receptor y menor actividad de la NA la cual participa en la liberación del virus, pero cuando se presenta una NA con un tallo intacto es necesario que se presenten menos sitios de N-glicosilación próximos al sitio de corte y con ello presentar mayor afinidad al receptor y mayor actividad de la neuraminidasa para romper la unión de la HA de su receptor celular, no obstante combinaciones que difieren de estas perjudican en primera lugar a la adsorción y penetración del virus hacia la célula ⁴⁵⁻⁴⁷.

A este respecto Matrozovich M, et al. (1999) encontró que sus aislados virales del subtipo H5N1 se diferenciaban de los virus H5 de aves acuáticas silvestres por una eliminación de 19 aminoácidos en el tallo de la NA y la presencia de un hidrato de carbono en la cabeza globular de la HA.⁷⁶ Con ello también se les suma el trabajo de Li J, et al. (2011) en el cual se analizó 4,920 secuencias de aminoácidos de 16 subtipos de NA y solo observó la pérdida parcial del tallo en el 45% de las secuencias analizadas (2,238) siendo los subtipos N1-N3 y N5-N7 en los que se notaron eliminaciones con mayor

frecuencia pero solo cuando coinciden con los subtipos de hemoaglutinina H5, H7 y H9, dicho de otra forma las combinaciones entre ellos, particularmente en VIA de los subtipos H5N1, H5N2, H7N1, H7N2 y H7N7, ⁴⁸ que a su vez portaban los mismos sitios de glicosilación en la HA reportados anteriormente por Baigent et al. (2001) y Zhao D, et al. (2017) los cuales eran necesarios en el incremento de la virulencia en pollos y en ratones respectivamente ^{45,77} donde la posición de los sitios de glicosilación en la HA se destaca que es propia de cada subtipo. ⁴⁸

La hipótesis del presente análisis fue formulada con base en las investigaciones de tipo experimental que argumentan que hay marcadores de virulencia por sustitución de carácter zoonótico, por ejemplo E627K en la PB2, quien es la más citada en los trabajos cuando se caracteriza un virus, dando por hecho que su presencia es fundamental para que un virus de origen aviar se adapte a huéspedes mamíferos ^{78,79}, no obstante profundizando todavía más en las investigaciones relacionadas, la cual se realizó a la par durante el desarrollo del análisis de las mutaciones asociadas a la alta patogenicidad en las aves de corral ⁸⁰, se demostró que ciertos aislados virales no necesitan de la mutación por sustitución E627K para provocar una enfermedad leve o grave en los humanos, tal es el caso de la pandemia de H1N1 donde los virus utilizaron otro tipo de marcador de adaptación para presentar daños en la población humana ^{37,81}.

VIII. CONCLUSIONES

- De acuerdo al análisis realizado, los virus causantes de la influenza aviar en este caso de los subtipos H5 y H7 sufren una evolución paralela y escalonada respecto al fenotipo de alta patogenicidad, ya que surgen de un ancestro en común, posteriormente forman clados separándose filogenéticamente y por otro lado pueden adaptarse a las aves domésticas (pollos, guajolotes, gallinas de guinea, codornices, etc.) para provocar una enfermedad que en la mayoría de los casos conllevan a una leve enfermedad o pueden también causar una alta morbilidad y mortalidad de grandes parvadas sin utilizar exactamente los mismos marcadores de virulencia.

- Todos los virus de alta patogenicidad de los subtipos H5 y H7 concentran más de dos aminoácidos básicos en el sitio de corte (que comprende entre posiciones 335-343 para el subtipo H5 y 331-340 para el subtipo H7) de la hemoaglutinina, por lo que sin duda los virus de influenza aviar de baja patogenicidad de los mismos subtipos durante su camino escalonado hacia una alta virulencia forzosamente necesitan adquirir este marcador de patogenicidad.

- La evidencia permite sugerir que en los futuros trabajos experimentales de los subtipos H5 y H7 de origen aviar se acentúe el equilibrio de la HA-NA y su impacto en la adaptación, replicación, morbilidad y mortalidad en pollos.

- En un panorama general de las mutaciones, no existe un único aminoácido que sea más prevalente ni tampoco predominan aminoácidos que compartan la misma naturaleza (polar, apolar, ácido, básico o neutro), por lo que cada aminoácido cumple una función en específico de acuerdo a la posición donde se encuentre en la proteína y cualquier cambio que ocurra es dependiente a los errores en la codificación proteica, predominando los que sean favorables para el agente viral y su relación con la del huésped.

- Cuando los marcadores moleculares que aumentan o disminuyen la patogenicidad de los virus causantes de la influenza en las aves son diferentes entre cada uno, se debe a que dependen completamente del subtipo y la estructura genómica de la cepa considerando de igual manera el año, lugar ó especie de ave doméstica y silvestre donde esta se aisló.

- Para futuras investigaciones de virus de influenza aviar se propone crear una base de datos a partir de las mutaciones que han demostrado mediante el uso de la genética inversa ser partícipes en el aumento de la virulencia de una cepa, para que el análisis genómico de los aislados virales puedan explicar de mejor modo la patogenicidad en el caso de que se llegue a presentar alguna de estas mutaciones, tal y como ocurre con las mutaciones que mejoran la adaptación y transmisión entre mamíferos, como también la resistencia a los antivirales.

- Se encomienda el desarrollo de trabajos experimentales que engloben a las únicas mutaciones por sustitución que aparecieron de manera constante en todos los aislados virales en virus de influenza aviar de alta patogenicidad aislado.

- Todo el trabajo indicó que no se puede proceder a la estructuración de una nueva herramienta diagnóstica de tipo molecular para identificar un virus de alta patogenicidad diferentes a los que establece la OIE, todo a partir de lo analizado puesto que se demostró que la naturaleza de la patogenicidad es de tipo poligénica.

- El presente estudio describe una metodología utilizada para el análisis de virus de influenza aviar de alta patogenicidad haciendo uso de una de las herramientas de bioinformática para demostrar los cambios moleculares necesarios en cada uno en el incremento de la virulencia en aves de domésticas, y de esta manera apoyar a los futuros estudios pato biológicos.

IX. REFERENCIAS

1. International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>. Published 2017. Accessed November 23, 2017.
2. Williams SM, American Association of Avian Pathologists. *A Laboratory Manual for the Isolation, Identification and Characterization of Avian Pathogens*. 6th ed. Jacksonville, Fl. : American Association of Avian Pathologists,; 2016. https://franklin.library.upenn.edu/catalog/FRANKLIN_9970787643503681. Accessed July 2, 2018.
3. Tollis M, Trani L. Recent Developments in Avian Influenza Research: Epidemiology and Immunoprophylaxis. *Vet J*. 2002;164(3):202-215. doi:10.1053/TVJL.2002.0716.
4. CHEUNG TKW, POON LLM. Biology of Influenza A Virus. *Ann N Y Acad Sci*. 2007;1102(1):1-25. doi:10.1196/annals.1408.001.
5. Jagger BW, Wise HM, Kash JC, et al. An overlapping protein-coding region in influenza A virus segment 3 modulates the host response. *Science*. 2012;337(6091):199-204. doi:10.1126/science.1222213.
6. Wright P, Neumann G KY. *Fields Virology: Orthomyxoviruses*. Vol 1. 5th ed. (Lippincott W& W, ed.). Philadelphia; 2007.
7. Brown EG. Influenza virus genetics. *Biomed Pharmacother*. 2000;54(4):196-209. doi:10.1016/S0753-3322(00)89026-5.
8. Tong S, Zhu X, Li Y, et al. New World Bats Harbor Diverse Influenza A Viruses. Subbarao K, ed. *PLoS Pathog*. 2013;9(10):e1003657. doi:10.1371/journal.ppat.1003657.
9. Swayne DE. *Animal Influenza Virus*. Vol 1161. 13a ed. (David E. Swayne, JR Glisson, LR McDougald, LK Nolan, DL Suarez VN, ed.). Georgia, EUA; 2014. doi:10.1007/978-1-4939-0758-8.
10. SODA K, CHENG M-C, YOSHIDA H, et al. A Low Pathogenic H5N2 Influenza Virus Isolated in Taiwan Acquired High Pathogenicity by Consecutive Passages in Chickens. *J Vet Med Sci*. 2011;73(6):767-772. doi:10.1292/jvms.10-0532.

11. Causey D, Edwards SV. Ecology of Avian Influenza Virus in Birds. *J Infect Dis.* 2008;197(s1):S29-S33. doi:10.1086/524991.
12. Petrini A, Vallat B. Notification of Avian Influenza and Newcastle Disease to the World Organisation for Animal Health (OIE). In: *Avian Influenza and Newcastle Disease*. Milano: Springer Milan; 2009:27-30. doi:10.1007/978-88-470-0826-7_3.
13. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural P y A (SAGARPA). ACUERDO mediante el cual se dan a conocer en los Estados Unidos Mexicanos las enfermedades y plagas exóticas y endémicas de notificación obligatoria de los animales terrestres y acuáticos. Diario Oficial de la Federación.
http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:Z9EUYxCzh5MJ:dof.gob.mx/nota_to_doc.php%3Fcodnota%3D5436016+&cd=1&hl=es&ct=clnk&gl=mx. Published 2016. Accessed October 28, 2017.
14. Chen R, Holmes EC. Avian Influenza Virus Exhibits Rapid Evolutionary Dynamics. *Mol Biol Evol.* 2006;23(12):2336-2341. doi:10.1093/molbev/msl102.
15. Banks J, Speidel EC, McCauley JW, Alexander DJ. Phylogenetic analysis of H7 haemagglutinin subtype influenza A viruses. *Arch Virol.* 2000;145(5):1047-1058. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10881690>. Accessed October 29, 2017.
16. Rott R. The pathogenic determinant of influenza virus. *Vet Microbiol.* 1992;33(1-4):303-310. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1481363>. Accessed October 29, 2017.
17. World Organisation for Animal Health (OIE). INFLUENZA AVIAR (INFECCIÓN POR LOS VIRUS DE LA INFLUENZA AVIAR). Manual Terrestre de la OIE.
http://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahm/2.03.04_AI.pdf. Published 2015. Accessed October 29, 2017.
18. Rogers GN, Paulson JC. Receptor determinants of human and animal influenza virus isolates: differences in receptor specificity of the H3 hemagglutinin based on species of origin. *Virology.* 1983;127(2):361-373. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6868370>. Accessed October 29, 2017.

19. Horimoto T, Rivera E, Pearson J, Senne D, Krauss S, Kawaoka Y WR. Origin and Molecular Changes Associated with Emergence of a Highly Pathogenic H5N2 Influenza Virus in Mexico. *Virology*. 1995;213(1):223-230. doi:10.1006/VIRO.1995.1562.
20. Spackman E, Senne DA, Davison S, Suarez DL. Sequence analysis of recent H7 avian influenza viruses associated with three different outbreaks in commercial poultry in the United States. *J Virol*. 2003;77(24):13399-13402. doi:10.1128/JVI.77.24.13399-13402.2003.
21. Garcia M, Crawford JM, Latimer JW, Rivera-Cruz E, Perdue ML. Heterogeneity in the haemagglutinin gene and emergence of the highly pathogenic phenotype among recent H5N2 avian influenza viruses from Mexico. *J Gen Virol*. 1996;77(7):1493-1504. doi:10.1099/0022-1317-77-7-1493.
22. Suarez DL, Senne DA, Banks J, et al. Recombination Resulting in Virulence Shift in Avian Influenza Outbreak, Chile. *Emerg Infect Dis*. 2004;10(4):693-699. doi:10.3201/eid1004.030396.
23. Webster RG, Kawaoka Y, Bean WJ. Molecular changes in A/Chicken/Pennsylvania/83 (H5N2) influenza virus associated with acquisition of virulence. *Virology*. 1986;149(2):165-173. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3946082>. Accessed October 29, 2017.
24. Wood GW, McCauley JW, Bashiruddin JB, Alexander DJ. Deduced amino acid sequences at the haemagglutinin cleavage site of avian influenza A viruses of H5 and H7 subtypes. *Arch Virol*. 1993;130(1-2):209-217. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8503786>. Accessed October 29, 2017.
25. Vey M, Orlich M, Adler S, Klenk HD, Rott R, Garten W. Hemagglutinin activation of pathogenic avian influenza viruses of serotype H7 requires the protease recognition motif R-X-K/R-R. *Virology*. 1992;188(1):408-413. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1566583>. Accessed October 29, 2017.

26. Röhm C, Horimoto T, Kawaoka Y, Süß J, Webster RG. Do hemagglutinin genes of highly pathogenic avian influenza viruses constitute unique phylogenetic lineages? *Virology*. 1995;209(2):664-670. doi:10.1006/viro.1995.1301.
27. Bogs J, Veits J, Gohrbandt S, et al. Highly Pathogenic H5N1 Influenza Viruses Carry Virulence Determinants beyond the Polybasic Hemagglutinin Cleavage Site. Zhang L, ed. *PLoS One*. 2010;5(7):e11826. doi:10.1371/journal.pone.0011826.
28. Stech O, Veits J, Weber S, et al. Acquisition of a polybasic hemagglutinin cleavage site by a low-pathogenic avian influenza virus is not sufficient for immediate transformation into a highly pathogenic strain. *J Virol*. 2009;83(11):5864-5868. doi:10.1128/JVI.02649-08.
29. WORLD HEALTH ORGANIZATION EXPERT COMMITTEE. A revision of the system of nomenclature for influenza viruses: a WHO memorandum. *Bull World Health Organ*. 1980;58(4):585-591. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6969132>. Accessed August 2, 2018.
30. Swayne DE, Suarez DL. Highly pathogenic avian influenza. *Rev sci tech Off int Epiz*. 2000;19(2):463-482. <https://pdfs.semanticscholar.org/6d7b/7e98e3b8f7527819a2f060d9a1fc6b0781f2.pdf>. Accessed July 12, 2018.
31. OFFLU. Influenza A Cleavage Sites. 2018. http://www.offlu.net/fileadmin/home/en/resource-centre/pdf/Influenza_A_Cleavage_Sites.pdf. Accessed July 12, 2018.
32. Richard M, Fouchier R, Monne I, Kuiken T. EXTERNAL SCIENTIFIC REPORT Mechanisms and risk factors for mutation from low to highly pathogenic avian influenza virus. 2017. doi:10.2903/sp.efsa.2017.EN-1287.
33. Alexander DJ, Brown IH. History of highly pathogenic avian influenza. *Rev sci tech Off int Epiz*. 2009;28(1):19-38. <https://pdfs.semanticscholar.org/ef84/d57f935e2f106351e9e16f944f855b0173bb.pdf>. Accessed July 24, 2018.

34. DesRochers BL, Chen RE, Gounder AP, Pinto AK, Bricker T, Linton CN, Rogers CD, Williams GD, Webby RJ BA. Residues in the PB2 and PA genes contribute to the pathogenicity of avian H7N3 influenza A virus in DBA/2 mice. *Virology*. 2016;494:89-99. doi:10.1016/J.VIROL.2016.04.013.
35. Li Q, Wang X, Sun Z, Hu J, Gao Z, Hao X, Li J, Liu H, Wang X, Gu M, Xu X, Liu X LX. Adaptive mutations in PB2 gene contribute to the high virulence of a natural reassortant H5N2 avian influenza virus in mice. *Virus Res*. 2015;210:255-263. doi:10.1016/J.VIRUSRES.2015.08.017.
36. Czudai-Matwich V, Otte A, Matrosovich M, Gabriel G, Klenk H-D. PB2 mutations D701N and S714R promote adaptation of an influenza H5N1 virus to a mammalian host. *J Virol*. 2014;88(16):8735-8742. doi:10.1128/JVI.00422-14.
37. Arai Y, Kawashita N, Daidoji T, et al. Novel Polymerase Gene Mutations for Human Adaptation in Clinical Isolates of Avian H5N1 Influenza Viruses. Subbarao K, ed. *PLoS Pathog*. 2016;12(4):e1005583. doi:10.1371/journal.ppat.1005583.
38. Wang C, Lee HHY, Yang ZF, Mok CKP, Zhang Z. PB2-Q591K Mutation Determines the Pathogenicity of Avian H9N2 Influenza Viruses for Mammalian Species. Pöhlmann S, ed. *PLoS One*. 2016;11(9):e0162163. doi:10.1371/journal.pone.0162163.
39. Tada T, Suzuki K, Sakurai Y, et al. NP body domain and PB2 contribute to increased virulence of H5N1 highly pathogenic avian influenza viruses in chickens. *J Virol*. 2011;85(4):1834-1846. doi:10.1128/JVI.01648-10.
40. Suzuki Y, Uchida Y, Tanikawa T, Maeda N, Takemae N, Saito T. Amino acid substitutions in PB1 of avian influenza viruses influence pathogenicity and transmissibility in chickens. *J Virol*. 2014;88(19):11130-11139. doi:10.1128/JVI.01564-14.
41. Yamamoto N, Soda K, Sakoda Y, Okamatsu M, Kida H. Proteins of duck influenza virus responsible for acquisition of pathogenicity in chickens. *Virus Res*. 2013;173(2):294-298. doi:10.1016/J.VIRUSRES.2013.02.001.
42. Veits J, Weber S, Stech O, et al. Avian influenza virus hemagglutinins H2, H4, H8, and H14 support a highly pathogenic phenotype. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(7):2579-2584. doi:10.1073/pnas.1109397109.

43. Hu J, Mo Y, Wang X, et al. PA-X decreases the pathogenicity of highly pathogenic H5N1 influenza A virus in avian species by inhibiting virus replication and host response. *J Virol.* 2015;89(8):4126-4142. doi:10.1128/JVI.02132-14.
44. Perdue ML, Latimer JW, Crawford JM. A Novel Carbohydrate Addition Site on the Hemagglutinin Protein of a Highly Pathogenic H7 Subtype Avian Influenza Virus. *Virology.* 1995;213(1):276-281. doi:10.1006/VIRO.1995.1571.
45. Baigent SJ, McCauley JW. Glycosylation of haemagglutinin and stalk-length of neuraminidase combine to regulate the growth of avian influenza viruses in tissue culture. *Virus Res.* 2001;79(1-2):177-185. doi:10.1016/S0168-1702(01)00272-6.
46. Wagner R, Wolff T, Herwig A, Pleschka S, Klenk HD. Interdependence of hemagglutinin glycosylation and neuraminidase as regulators of influenza virus growth: a study by reverse genetics. *J Virol.* 2000;74(14):6316-6323. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10864641>. Accessed June 4, 2018.
47. Ohuchi M, Ohuchi R, Feldmann A, Klenk HD. Regulation of receptor binding affinity of influenza virus hemagglutinin by its carbohydrate moiety. *J Virol.* 1997;71(11):8377-8384. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9343193>. Accessed June 13, 2018.
48. Li J, Zu Dohna H, Cardona CJ, Miller J, Carpenter TE. Emergence and genetic variation of neuraminidase stalk deletions in avian influenza viruses. *PLoS One.* 2011;6(2):e14722. doi:10.1371/journal.pone.0014722.
49. Gohrbandt S, Veits J, Hundt J, et al. Amino acids adjacent to the haemagglutinin cleavage site are relevant for virulence of avian influenza viruses of subtype H5. *J Gen Virol.* 2011;92(1):51-59. doi:10.1099/vir.0.023887-0.
50. Maruyama J, Okamatsu M, Soda K, Sakoda Y, Kida H. Factors responsible for pathogenicity in chickens of a low-pathogenic H7N7 avian influenza virus isolated from a feral duck. *Arch Virol.* 2013;158(12):2473-2478. doi:10.1007/s00705-013-1762-z.

51. Abdelwhab E-SM, Veits J, Tauscher K, et al. A Unique Multibasic Proteolytic Cleavage Site and Three Mutations in the HA2 Domain Confer High Virulence of H7N1 Avian Influenza Virus in Chickens. *J Virol.* 2015;90(1):400-411. doi:10.1128/JVI.02082-15.
52. Wasilenko JL, Lee CW, Sarmiento L, et al. NP, PB1, and PB2 viral genes contribute to altered replication of H5N1 avian influenza viruses in chickens. *J Virol.* 2008;82(9):4544-4553. doi:10.1128/JVI.02642-07.
53. Wasilenko JL, Sarmiento L, Pantin-Jackwood MJ. A single substitution in amino acid 184 of the NP protein alters the replication and pathogenicity of H5N1 avian influenza viruses in chickens. *Arch Virol.* 2009;154(6):969-979. doi:10.1007/s00705-009-0399-4.
54. Tada T, Suzuki K, Sakurai Y, et al. Emergence of avian influenza viruses with enhanced transcription activity by a single amino acid substitution in the nucleoprotein during replication in chicken brains. *J Virol.* 2011;85(19):10354-10363. doi:10.1128/JVI.00605-11.
55. Isoda N, Tsuda Y, Asakura S, Okamatsu M, Sakoda Y, Kida H. The nucleoprotein is responsible for intracerebral pathogenicity of A/duck/Mongolia/47/2001 (H7N1) in chicks. *Arch Virol.* 2012;157(12):2257-2264. doi:10.1007/s00705-012-1415-7.
56. Munier S, Larcher T, Cormier-Aline F, et al. A genetically engineered waterfowl influenza virus with a deletion in the stalk of the neuraminidase has increased virulence for chickens. *J Virol.* 2010;84(2):940-952. doi:10.1128/JVI.01581-09.
57. Sorrell EM, Song H, Pena L, Perez DR. A 27-amino-acid deletion in the neuraminidase stalk supports replication of an avian H2N2 influenza A virus in the respiratory tract of chickens. *J Virol.* 2010;84(22):11831-11840. doi:10.1128/JVI.01460-10.
58. Gu M, Liu W, Cao Y, et al. Novel reassortant highly pathogenic avian influenza (H5N5) viruses in domestic ducks, China. *Emerg Infect Dis.* 2011;17(6):1060-1063. doi:10.3201/eid1706.101406.
59. Li X, Fu Y, Yang J, et al. Genetic and biological characterization of two novel reassortant H5N6 swine influenza viruses in mice and chickens. *Infect Genet Evol.* 2015;36:462-466. doi:10.1016/J.MEEGID.2015.08.017.

60. Pu J, Sun H, Qu Y, et al. M Gene Reassortment in H9N2 Influenza Virus Promotes Early Infection and Replication: Contribution to Rising Virus Prevalence in Chickens in China. *J Virol.* 2017;91(8):e02055-16. doi:10.1128/JVI.02055-16.
61. Nao N, Kajihara M, Manzoor R, et al. A Single Amino Acid in the M1 Protein Responsible for the Different Pathogenic Potentials of H5N1 Highly Pathogenic Avian Influenza Virus Strains. *PLoS One.* 2015;10(9):e0137989. doi:10.1371/journal.pone.0137989.
62. Li Z, Jiang Y, Jiao P, et al. The NS1 gene contributes to the virulence of H5N1 avian influenza viruses. *J Virol.* 2006;80(22):11115-11123. doi:10.1128/JVI.00993-06.
63. Zhu Q, Yang H, Chen W, et al. A naturally occurring deletion in its NS gene contributes to the attenuation of an H5N1 swine influenza virus in chickens. *J Virol.* 2008;82(1):220-228. doi:10.1128/JVI.00978-07.
64. Li KS, Guan Y, Wang J, et al. Genesis of a highly pathogenic and potentially pandemic H5N1 influenza virus in eastern Asia. *Nature.* 2004;430(6996):209-213. doi:10.1038/nature02746.
65. Guan Y, Poon LLM, Cheung CY, et al. H5N1 influenza: a protean pandemic threat. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(21):8156-8161. doi:10.1073/pnas.0402443101.
66. Long J-X, Peng D-X, Liu Y-L, Wu Y-T, Liu X-F. Virulence of H5N1 avian influenza virus enhanced by a 15-nucleotide deletion in the viral nonstructural gene. *Virus Genes.* 2008;36(3):471-478. doi:10.1007/s11262-007-0187-8.
67. Cauthen AN, Swayne DE, Sekellick MJ, Marcus PI, Suarez DL. Amelioration of influenza virus pathogenesis in chickens attributed to the enhanced interferon-inducing capacity of a virus with a truncated NS1 gene. *J Virol.* 2007;81(4):1838-1847. doi:10.1128/JVI.01667-06.
68. Abdelwhab E-SM, Veits J, Breithaupt A, et al. Prevalence of the C-terminal truncations of NS1 in avian influenza A viruses and effect on virulence and replication of a highly pathogenic H7N1 virus in chickens. *Virulence.* 2016;7(5):546-557. doi:10.1080/21505594.2016.1159367.
69. Hoffmann TW, Munier S, Larcher T, et al. Length variations in the NA stalk of an H7N1 influenza virus have opposite effects on viral excretion in

- chickens and ducks. *J Virol.* 2012;86(1):584-588. doi:10.1128/JVI.05474-11.
70. Stech O, Veits J, Abdelwhab E-SM, Wessels U, Mettenleiter TC, Stech J. The Neuraminidase Stalk Deletion Serves as Major Virulence Determinant of H5N1 Highly Pathogenic Avian Influenza Viruses in Chicken. *Sci Rep.* 2015;5(1):13493. doi:10.1038/srep13493.
 71. 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.* 2001;146(12):2275-2289. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11811679>. Accessed August 1, 2018.
 72. Pu J, Wang S, Yin Y, et al. Evolution of the H9N2 influenza genotype that facilitated the genesis of the novel H7N9 virus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015;112(2):548-553. doi:10.1073/pnas.1422456112.
 73. Lipatov AS, Andreansky S, Webby RJ, et al. Pathogenesis of Hong Kong H5N1 influenza virus NS gene reassortants in mice: the role of cytokines and B- and T-cell responses. *J Gen Virol.* 2005;86(4):1121-1130. doi:10.1099/vir.0.80663-0.
 74. Londt BZ, Banks J, Alexander DJ. Highly pathogenic avian influenza viruses with low virulence for chickens in in vivo tests. 2010. doi:10.1080/03079450701589134.
 75. Lee C-W, Swayne DE, Linares JA, Senne DA, Suarez DL. H5N2 avian influenza outbreak in Texas in 2004: the first highly pathogenic strain in the United States in 20 years? *J Virol.* 2005;79(17):11412-11421. doi:10.1128/JVI.79.17.11412-11421.2005.
 76. 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.* 1999;73(2):1146-1155. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9882316>. Accessed July 17, 2018.
 77. Zhao D, Liang L, Wang S, et al. Glycosylation of the Hemagglutinin Protein of H5N1 Influenza Virus Increases Its Virulence in Mice by Exacerbating the Host Immune Response. *J Virol.* 2017;91(7). doi:10.1128/JVI.02215-16.
 78. Bussey KA, Bousse TL, Desmet EA, Kim B, Takimoto T. PB2 residue 271
- Análisis in silico de las mutaciones de alta patogenicidad descritas en los virus de influenza aviar*
Sergio David Rodríguez Toledano

- plays a key role in enhanced polymerase activity of influenza A viruses in mammalian host cells. *J Virol.* 2010;84(9):4395-4406. doi:10.1128/JVI.02642-09.
79. Xiao C, Ma W, Sun N, et al. PB2-588 V promotes the mammalian adaptation of H10N8, H7N9 and H9N2 avian influenza viruses. *Sci Rep.* 2016;6:19474. doi:10.1038/srep19474.
 80. Murphy B, Sly D, Tierney E, et al. Reassortant virus derived from avian and human influenza A viruses is attenuated and immunogenic in monkeys. *Science (80-).* 1982;218(4579):1330-1332. doi:10.1126/science.6183749.
 81. Subbarao EK, London W, Murphy BR. A single amino acid in the PB2 gene of influenza A virus is a determinant of host range. *J Virol.* 1993;67(4):1761-1764. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8445709>. Accessed August 4, 2018.
 82. Kim H-R, Lee Y-J, Park C-K, et al. Highly pathogenic avian influenza (H5N1) outbreaks in wild birds and poultry, South Korea. *Emerg Infect Dis.* 2012;18(3):480-483. doi:10.3201/eid1803.111490.
 83. Berhane Y, Kobasa D, Embury-Hyatt C, et al. Pathobiological Characterization of a Novel Reassortant Highly Pathogenic H5N1 Virus Isolated in British Columbia, Canada, 2015. *Sci Rep.* 2016;6(1):23380. doi:10.1038/srep23380.
 84. Wagner R, Gabriel G, Schlesner M, et al. Protease activation mutants elicit protective immunity against highly pathogenic avian influenza viruses of subtype H7 in chickens and mice. *Emerg Microbes Infect.* 2013;2(2):e7-e7. doi:10.1038/emi2013.7.
 85. Graaf A, Beer M, Harder T. Real-time reverse transcription PCR-based sequencing-independent pathotyping of Eurasian avian influenza A viruses of subtype H7. doi:10.1186/s12985-017-0808-3.
 86. Monne I, Fusaro A, Nelson MI, et al. Emergence of a highly pathogenic avian influenza virus from a low-pathogenic progenitor. *J Virol.* 2014;88(8):4375-4388. doi:10.1128/JVI.03181-13.
 87. Bischoff R, Schlüter H. Amino acids: Chemistry, functionality and selected non-enzymatic post-translational modifications. *J Proteomics.* 2012;75(8):2275-2296. doi:10.1016/J.JPROT.2012.01.041.

X. ANEXOS

- I. Mutaciones que intervienen en la expresión de la patogenicidad reportadas a partir de evidencia experimental.
- II. Cepas utilizadas para realizar el análisis bajo los criterios establecidos en la metodología.
- III. Mapa geográfico que representa los puntos donde se aislaron las cepas utilizadas en el análisis.
- IV. Claves de las cepas y sus secuencias disponibles en el GenBank.
- V. Identificación y clasificación de los aminoácidos

I. Mutaciones que intervienen en la expresión de la patogenicidad reportadas a partir de evidencia experimental.

En el cuadro se muestra la proteína, mutación implicada, autores, año y la referencia.

| Proteína | Mutación | Autores | Año | Ref. |
|----------|--|----------------------------------|------|------|
| PB2 | Sustitución K123E | Maruyama J. et al. | 2013 | 50 |
| PB1 | Sustitución A14V | Suzuki Y, et al. | 2014 | 40 |
| PB1 | Sustitución N16D | Maruyama J. et al. | 2013 | 50 |
| PB1 | Sustitución C38Y | Suzuki Y, et al. | 2014 | 40 |
| PA | Sustitución L672F | Yamamoto N, et al. | 2013 | 41 |
| PA-X | Supresión de la proteína | Hu J, et al. | 2015 | 43 |
| HA | Sustitución T13K / Desglicosilación en el sitio 11 | Webster RG, Kawaoka Y, et al. | 1986 | 23 |
| HA | N-Glicosilación en la posición 123 en combinación con eliminación de aminoácidos en el tallo de la NA | Baigent S.J., et al. | 2001 | 45 |
| HA | N-Glicosilación en la posición 149 en combinación con eliminación de aminoácidos en el tallo de la NA | Baigent S.J., et al. | 2001 | 45 |
| HA | Sustitución S188N / N- glicosilación en la posición 188 | Perdue ML, et al. | 1995 | 44 |
| HA | Sustitución E227G | Maruyama J. et al. | 2013 | 50 |
| HA | Sustitución H308Q | Yamamoto N, et al. | 2013 | 41 |
| HA | Inserción 338R | Yamamoto N, et al. | 2013 | 41 |
| HA | Sustitución V346T/S | Gohrbandt S. et al | 2011 | 49 |
| HA | Sustitución I388T | Maruyama J. et al. | 2013 | 50 |
| HA | Sustitución A436T | Abdelwhab E. et al. | 2015 | 51 |
| HA | Sustitución Q450L | Abdelwhab E. et al. | 2015 | 51 |
| HA | Sustitución K536R | Abdelwhab E. et al. | 2015 | 51 |
| NP | Sustitución S50N | Isoda N., et al. | 2013 | 55 |
| NP | Sustitución F98K | Isoda N., et al. | 2013 | 55 |
| NP | Sustitución M105V | Tada T., et al. | 2011 | 39 |
| NP | Sustitución I109T | Tada T. et al. | 2011 | 54 |
| NP | Sustitución A184K | Wasilenko J.L. et al. | 2009 | 53 |
| NP | Sustitución M374V | Yamamoto N. et al. | 2013 | 41 |

| | | | | |
|-----|--|-----------------------|------|----|
| NA | Eliminación de 19 a 27 aminoácidos en el tallo de la NA. | Munier S. et al. | 2010 | 56 |
| | | Sorrell E.M. et al. | 2010 | 57 |
| | | Hoffmann T.W. et al. | 2012 | 69 |
| | | Stech O. et al. | 2015 | 70 |
| M1 | Sustitución T37A | Pu J. et al. | 2017 | 60 |
| M1 | Sustitución I43M | Nao N. et al. | 2015 | 61 |
| M1 | Sustitución D89N | Yamamoto N. et al. | 2013 | 41 |
| M1 | Sustitución R95K | Pu J. et al. | 2017 | 60 |
| M1 | Sustitución R101K | Yamamoto N. et al. | 2013 | 41 |
| M1 | Sustitución S224N | Pu J. et al. | 2017 | 60 |
| M1 | Sustitución G228R | Maruyama J. et al. | 2013 | 50 |
| M1 | Sustitución K242N | Pu J. et al. | 2017 | 60 |
| M2 | Sustitución D21G | Pu J. et al. | 2017 | 60 |
| M2 | Sustitución R45H | Yamamoto N. et al. | 2013 | 41 |
| M2 | Sustitución L46P | Maruyama J. et al. | 2013 | 50 |
| NS1 | Sustitución G148E | Wasilenko J.L. et al. | 2009 | 53 |
| NS1 | Sustitución V149A | Li Z. et al. | 2006 | 62 |
| NS1 | Eliminación 80-84/sustitución | Long J-X. et al. | 2008 | 66 |
| NS1 | Eliminación 191-195 | Zhu Q. et al. | 2008 | 63 |
| NS1 | Eliminación de aminoácidos en el carboxilo terminal. | Abdelwhab E. et al. | 2016 | 68 |

II. Cepas utilizadas para realizar el análisis bajo los criterios establecidos en la metodología.

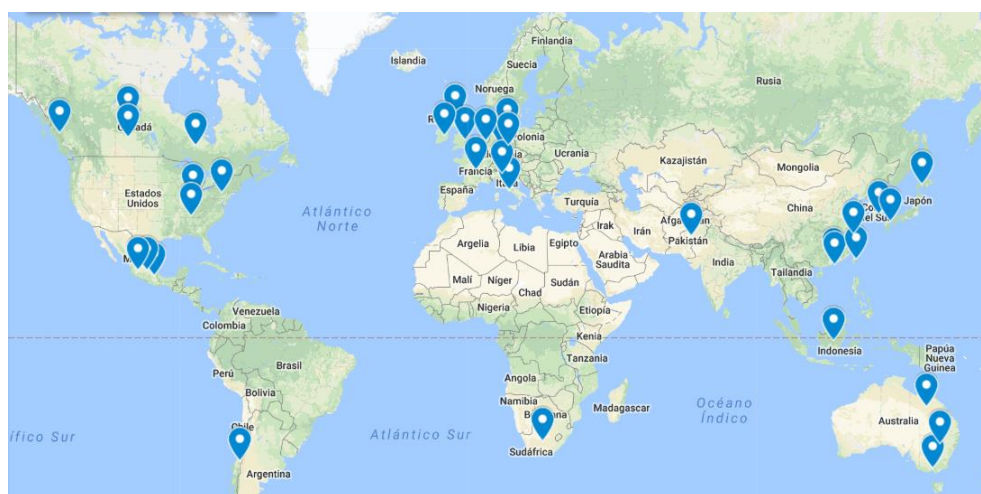
En el cuadro se muestran la clave, el subtipo, la cepa y las referencias.

| Clave | Subtipo | Cepa | Ref. |
|-------|---------|--|----------|
| 1 | H5N1 | A/chicken/Scotland/1959 | 30-32 |
| 2 | H5N1 | A/turkey/England/50-92/1991 | 30-32 |
| 3 | H5N1 | A/goose/Guangdong/1/1996 | 32,74 |
| 4 | H5N1 | A/avian/Italy/1485/1997 | 31 |
| 5 | H5N1 | A/Chicken/Hong Kong/220/97 | 30 |
| 6 | H5N1 | A/chicken/Korea/es/2003 | 82 |
| 7 | H5N1 | A/chicken/Indonesia/7/2003 | 53 |
| 8 | H5N1 | A/chicken/Yamaguchi/7/2004 | 39,40,54 |
| 9 | H5N1 | A/chicken/Korea/IS/2006 | 82 |
| 10 | H5N1 | A/swan/Germany/R65/2006 | 49 |
| 11 | H5N1 | A/chicken/Korea/Gimje/2008 | 82 |
| 12 | H5N1 | A/duck/Hokkaido/WZ101/2010 | 61 |
| 13 | H5N1 | A/chicken/BC/FAV2/2015 | 83 |
| 14 | H5N1 | A/chicken/France/150169a/2015 | 31,32 |
| 15 | H5N2 | A/chicken/Pennsylvania/1370/1983 | 30-32,74 |
| 16 | H5N2 | A/chicken/Puebla/8623-607/1994 | 30-32 |
| 17 | H5N2 | A/chicken/Puebla/14586-654/1994 | 21 |
| 18 | H5N2 | A/chicken/Queretaro/14588-19/1995 | 30 |
| 19 | H5N2 | A/chicken/Italy/330/1997 *(A/poultry/Italy/330/1997) | 30,32 |
| 20 | H5N2 | A/ostrich/South Africa/N227/2004 | 32 |
| 21 | H5N2 | A/ostrich/South Africa/AI1091/2006 | 32 |
| 22 | H5N2 | A/ostrich/South Africa/AI2114/2011 | 31,32 |
| 23 | H5N2 | A/chicken/Taiwan/A1997/2012 | 31 |
| 24 | H5N2 | A/duck/France/150233/2015 | 31,32 |
| 25 | H5N3 | A/tern/South Africa/1961 | 30-32 |
| 26 | H5N5 | A/duck/Eastern China/008/2008 | 58 |
| 27 | H5N5 | A/duck/Eastern China/031/2009 | 58 |
| 28 | H5N6 | A/swine/Guangdong/1/2014 | 59 |
| 29 | H5N6 | A/swine/Guangdong/2/2014 | 59 |
| 30 | H5N8 | A/turkey/Ireland/1378/1983 | 30-32 |
| 31 | H5N9 | A/turkey/Ontario/7732/1966 | 30-32 |
| 32 | H5N9 | A/duck/France/150236/2015 | 31,32 |
| 33 | H7N1 | A/FPV/Rostock/34 | 42,84 |
| 34 | H7N1 | A/chicken/Rostock/45/1934 | 85 |
| 35 | H7N1 | A/turkey/Italy/4580/1999 | 30,32,42 |
| 36 | H7N1 | A/turkey/Italy/4708/1999 | 30,32,86 |
| 37 | H7N3 | A/turkey/England/1963 | 30-32 |
| 38 | H7N3 | A/chicken/Victoria/224/1992 | 30-32 |
| 39 | H7N3 | A/chicken/Queensland/1994 | 31,32 |
| 40 | H7N3 | A/chicken/Pakistan/447/1995 | 30-32 |
| 41 | H7N3 | A/chicken/Pakistan/34669/1995 | 30 |
| 42 | H7N3 | A/chicken/Pakistan/1369-CR2/1995 | 30 |

| | | | |
|----|------|--|-------|
| 43 | H7N3 | A/chicken/Chile/4957/02 | 31,32 |
| 44 | H7N3 | A/chicken/Chile/184240-4322/2002 | 31,32 |
| 45 | H7N3 | A/Canada/rv504/2004 | 31 |
| 46 | H7N3 | A/GSC_chicken_B/British Columbia/04 | 32 |
| 47 | H7N3 | A/chicken/SK/HR-00011/2007 | 31,32 |
| 48 | H7N3 | A/chicken/Jalisco/CPA1/2012 | 31 |
| 49 | H7N3 | A/chicken/Jalisco/12283/2012 | 32 |
| 50 | H7N3 | A/chicken/Jalisco/CPA-01859-16-CENASA-95294/2016 | 31 |
| 51 | H7N3 | A/chicken/Puebla/CPA-04451-16-CENASA-95294/2016 | 31 |
| 52 | H7N4 | A/chicken/New South Wales/2/1997 | 30-32 |
| 53 | H7N7 | A/chicken/Brescia/1902 | 33 |
| 54 | H7N7 | A/chicken/Victoria/1976 | 30-32 |
| 55 | H7N7 | A/goose/Leipzig/187-7/1979 | 31 |
| 56 | H7N7 | A/chicken/Victoria/1985 | 30-32 |
| 57 | H7N7 | A/chicken/Netherlands/1/03 | 32 |
| 58 | H7N8 | A/turkey/Indiana/16-001403-1/2016 | 31,32 |
| 59 | H7N9 | A/chicken/Guangdong/GD15/2016 | 31 |
| 60 | H7N9 | A/chicken/Tennessee/17-007147-2/2017 | 31 |

III. Mapa geográfico que representa los puntos donde se aislaron las cepas utilizadas en el análisis.

En la figura simula las localizaciones de cada aislado viral utilizado en el análisis. Se basó en la nomenclatura de las cepas donde se indica el lugar de aislamiento y en la literatura ^{30,32,33} para la ubicación de cada una. Se utilizó el software de "Google maps" para la representación.



IV. Claves de las cepas y sus secuencias disponibles en el GenBank.

En el cuadro se muestra la clave de la cepa, las secuencias disponibles: PB2, PB1, PB1-F2, PA, PA-X, HA, NP, NA, M1, M2, NS1, NS2/NEP, y el porcentaje de disponibilidad. La secuencia con X indica que está disponible, la secuencia con ND indica que la proteína no aparece, la secuencia con NP indica que no la presentó el propio virus y la secuencia con P indica que se encuentra de forma parcial.

| Clave de la cepa | PB 2 | PB 1 | PB 1-F2 | PA | PA-X | HA | NP | NA | M1 | M2 | NS1 | NS2/NEP |
|------------------|------|------|---------|----|------|----|----|----|----|----|-----|---------|
| 1 | X | X | X | X | ND | X | X | X | X | X | X | X |
| 2 | X | X | X | X | ND | X | X | X | X | X | X | X |
| 3 | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X |
| 4 | X | X | ND | P | ND | X | P | ND | X | X | X | X |
| 5 | P | X | ND | X | ND | X | X | X | X | X | X | X |
| 6 | X | X | ND | X | ND | X | X | X | X | X | X | X |
| 7 | X | X | ND | X | ND | X | X | X | X | X | X | X |
| 8 | X | X | ND | X | ND | X | X | X | X | X | X | X |
| 9 | P | X | X | X | ND | X | P | X | X | X | X | X |
| 10 | X | X | ND | X | ND | X | X | X | X | ND | X | ND |
| 11 | P | P | X | X | ND | P | X | P | X | P | X | P |
| 12 | X | X | X | X | ND | X | X | X | X | X | X | X |
| 13 | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X |
| 14 | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X |
| 15 | X | X | X | X | ND | X | X | X | X | X | X | X |
| 16 | P | P | ND | X | ND | X | X | X | X | ND | ND | ND |
| 17 | X | X | ND | X | ND | P | X | X | X | X | X | X |
| 18 | X | X | X | X | ND | X | X | X | X | X | X | X |
| 19 | X | X | X* | X* | ND | X* | X* | X | X | X | X | X |
| 20 | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X |
| 21 | X | X | X | X | X | X | P | X | X | X | X | X |
| 22 | X | X | X | X | ND | X | X | X | X | X | X | X |
| 23 | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X |
| 24 | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X |
| 25 | X | X | X | X | ND | X | X | X | X | X | X | X |
| 26 | X | X | X | X | ND | X | X | X | X | X | X | X |
| 27 | X | X | X | X | ND | X | X | X | X | X | X | X |
| 28 | X | X | NP | X | X | X | X | X | X | X | X | X |
| 29 | X | X | NP | X | X | X | X | X | X | X | X | X |
| 30 | X | X | X | X | ND | X | X | X | X | X | X | X |
| 31 | X | X | X | X | ND | X | X | P | X | X | X | X |
| 32 | X | X | NP | X | X | X | X | X | X | X | X | X |
| 33 | X | P | ND | X | ND | X | X | X | X | X | X | X |
| 34 | X | X | X | X | ND | X | X | X | X | X | X | X |
| 35 | X | X | X | X | ND | X | X | X | X | X | X | X |
| 36 | X | X | X | X | ND | X | X | X | X | X | X | X |
| 37 | X | X | X | X | ND | X | X | X | X | X | X | X |
| 38 | X | X | X | X | ND | X | X | X | X | X | X | X |
| 39 | X | X | X | X | ND | X | X | X | X | X | X | X |
| 40 | P | X | ND | X | ND | X | P | P | X | X | X | X |
| 41 | X | X | X | X | ND | X | X | X | X | X | X | X |

| | | | | | | | | | | | | |
|-------------------------------|----|-------|-------|-------|----|-------|-------|-------|-----|-------|-------|-------|
| 42 | P | X | ND | X | ND | P | P | P | X | X | X | X |
| 43 | P | P | ND | X | ND | X | X | X | X | P | ND | ND |
| 44 | ND | X | X | X | ND | X | X | ND | X | X | X | X |
| 45 | X | X | X | X | ND | X | X | X | X | X | X | X |
| 46 | X | X | ND | X | ND | X | X | X | X | X | X | X |
| 47 | X | X | ND | X | ND | X | X | X | X | X | X | X |
| 48 | X | X | ND | X | ND | X | X | X | X | X | X | X |
| 49 | X | X | X | X | ND | X | X | P | X | X | X | X |
| 50 | X | X | ND | X | ND | X | X | X | X | X | X | X |
| 51 | X | X | ND | X | ND | X | X | X | X | X | X | X |
| 52 | X | X | X | X | ND | X | X | X | X | X | X | X |
| 53 | X | X | ND | X | ND | X | X | X | X | X | X | X |
| 54 | X | X | X | X | ND | X | X | X | X | X | X | X |
| 55 | X | X | X | X | ND | X | X | X | X | X | X | X |
| 56 | X | X | X | X | ND | ND | X | X | X | X | X | X |
| 57 | P | X | ND | X | ND | X | X | X | X | ND | X | ND |
| 58 | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X |
| 59 | X | X | ND | X | ND | X | X | X | X | X | X | X |
| 60 | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X |
| Total de proteínas | 51 | 56 | 37 | 59 | 12 | 56 | 55 | 53 | 60 | 55 | 58 | 55 |
| % de disponibilidad (60=100%) | 85 | 93.33 | 61.66 | 98.33 | 20 | 93.33 | 91.66 | 88.33 | 100 | 91.66 | 96.66 | 91.66 |

V. Identificación y clasificación de los aminoácidos

En el cuadro se expone a los 20 aminoácidos, la abreviatura, símbolo, el tipo de carga, la polaridad y la presencia de anillo aromático ⁸⁷.

| Aminoácido | | | Carga | Polaridad | Anillo aromático |
|-----------------|------|---------|--------|-----------|------------------|
| Nombre | Abr. | Símbolo | | | |
| Alanina | Ala | A | Neutro | Apolar | - |
| Arginina | Arg | R | Básico | Polar | - |
| Asparagina | Asn | N | Neutro | Polar | - |
| Ácido aspártico | Asp | D | Ácido | Polar | - |
| Cisteína | Cys | C | Neutro | Polar | - |
| Glutamina | Gln | Q | Neutro | Polar | - |
| Ácido glutámico | Glu | E | Ácido | Polar | - |
| Glicina | Gly | G | Neutro | Apolar | - |
| Histidina | His | H | Básico | Polar | - |
| Isoleucina | Ile | I | Neutro | Apolar | - |
| Leucina | Leu | L | Neutro | Apolar | - |
| Lisina | Lys | K | Básico | Polar | - |
| Metionina | Met | M | Neutro | Apolar | - |
| Fenilalanina | Phe | F | Neutro | Apolar | Si |
| Prolina | Pro | P | Neutro | Apolar | - |
| Serina | Ser | S | Neutro | Polar | - |
| Treonina | Thr | T | Neutro | Polar | - |
| Triptófano | Trp | W | Neutro | Apolar | Si |
| Tirosina | Tyr | Y | Neutro | Polar | Si |
| Valina | Val | V | Neutro | Apolar | - |