

Tesina de Grado

UNIVERSIDAD DE LA REPUBLICA

Facultad de Ciencias

**ESTUDIO DE UNA ESTRATEGIA PARA EL ANALISIS DE  
GENOMAS DE VIRUS INFLUENZA A/H1N1 PANDEMICO  
CIRCULANTE EN URUGUAY EN EL AÑO 2009.**

Victoria Comas Almada  
Licenciatura en Bioquímica

Orientador: Natalia Goñi  
Co-orientador: Pilar Moreno  
Laboratorio de Virología Molecular

Marzo, 2012

<b>1. RESUMEN.....</b>	<b>4</b>
<b>2. INTRODUCCION.....</b>	<b>6</b>
2.1 Clasificación y Nomenclatura.....	7
2.2 Morfología y estructura del virión.....	8
2.3 Organización genómica.....	9
2.3.1 Genoma.....	9
2.3.2 Polimerasa.....	10
2.3.3 Hemaglutinina.....	11
2.3.4 Nucleoproteína.....	12
2.3.5 Neuraminidasa.....	13
2.3.6 Matriz.....	13
2.3.7 Proteína no estructural.....	14
2.4 Ciclo replicativo.....	16
2.4.1 Adsorción y Penetración.....	16
2.4.2 Transcripción y Traducción.....	17
2.4.3 Replicación.....	17
2.4.4 Ensamblaje y Brotamiento.....	18
2.5 Mecanismos de variabilidad genética.....	19
2.6 Ecología de los virus Influenza A.....	21
2.6.1 Epidemias.....	21
2.6.2 Pandemias.....	22
2.6.3 Historia evolutiva de los virus de la Influenza A.....	22
2.7 La enfermedad.....	28
2.8 Respuesta inmune.....	29
2.9 Prevención y control.....	30
2.9.1 Antivirales.....	30
2.9.2 Vacunas.....	32
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>34</b>
3.1 Objetivos generales.....	35
3.2 Objetivos específico.....	35
<b>4. MATERIALES Y METODOS.....</b>	<b>36</b>
4.1 Muestras.....	37
4.2 Extracción de ARN.....	37
4.3 Evaluación de la concentración y la calidad del ARN extraído.....	37
4.4 Diseño de cebadores.....	38
4.5 Transcripción y reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR).....	39
4.6 Electroforesis en gel de agarosa.....	42
4.7 Purificación de los productos de PCR.....	42

4.8 Clonación de los productos de PCR.....	43
4.8.1 Adenilacion.....	43
4.8.2 Ligación en vector pGEM-T-Easy.....	43
4.8.3 Transformación de los productos de ligación.....	44
4.8.4 Selección de transformantes y obtención de ADN plasmídico.....	45
4.8.5 Digestión con enzimas de restricción.....	45
4.9 Secuenciación.....	45
4.10 Análisis de secuencias.....	46
5.RESULTADOS.....	47
5.1 Evaluación del ARN extraído.....	48
5.2 Puesta a punto de la RT-PCR para los diferentes segmentos génicos del virus de la Influenza A H1N1.....	50
5.3 Análisis filogenéticos y caracterización molecular.....	54
6. DISCUSION.....	65
6.1 Evaluación del ARN extraído.....	66
6.2 Análisis filogenéticos y caracterización molecular.....	66
7. CONCLUSIONES.....	70
8. LISTA DE ABREVIATURAS.....	73
9. AGRADECIMIENTOS.....	76
10. BIBLIOGRAFIA.....	78

# 1. RESUMEN

El virus de la Influenza A (VIA) es un miembro de la familia *Orthomyxoviridae*, cuyo genoma está compuesto de 8 segmentos de ARN de polaridad negativa. VIA infecta a una gran variedad de especies aviares y mamíferos, en humanos causa infecciones respiratorias, siendo de gran importancia debido a sus altas tasas de morbilidad y mortalidad. Cambios frecuentes en la composición genética y antigénica constituyen la base de las epidemias y pandemias a nivel mundial. En marzo del 2009 un nuevo VIA pandémico (pdm) subtipo H1N1 de origen porcino emergió en México y se dispersó alrededor del mundo, siendo el causante de la primera pandemia del siglo XXI. El monitoreo de la composición genética de estos virus es esencial para entender la evolución dentro de un país con respecto a la diversificación a nivel mundial y buscar mutaciones que afecten el comportamiento del virus, de forma de implementar programas efectivos de prevención y control, así como para el diseño de nuevas vacunas apropiadas y efectivas para las cepas circulantes.

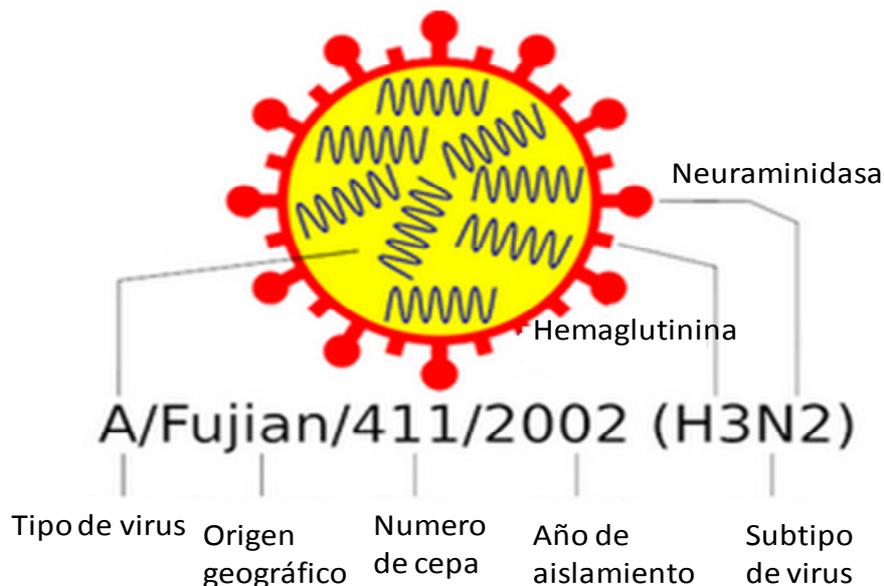
En este trabajo se propuso desarrollar una estrategia para obtener varios segmentos del genoma de este nuevo virus pandémico a través de retrotranscripción, reacción en cadena de la polimerasa y clonación. Se obtuvo para dos muestras de Uruguay las secuencias de los segmentos génicos HA, NA, NP, NS y M, siendo para estos últimos tres, las primeras secuencias obtenidas de VIA pdm que circularon en Uruguay en el año 2009. Se ha estudiado la variabilidad antigénica y genética de los VIA H1N1pdm mediante el análisis de secuencias de estos segmentos génicos. Se compararon las secuencias de estos con secuencias de otras partes del mundo y con la cepa vacunal recomendada para el hemisferio sur en el año 2010. Análisis filogenéticos con la información genética concatenada de estos segmentos permitió determinar que las cepas que circularon en Uruguay en el año 2009 pertenecen al clado 7, siendo el más distribuido a nivel global. Este análisis fue capaz de reflejar la historia evolutiva de las cepas pandémicas en una primer etapa de diversificación, ya reportada anteriormente. Durante el análisis filogenético de cada segmento génico como unidad individual, no se pudo determinar los 7 clados, sin embargo las secuencias de Uruguay se agruparon juntas con otras pertenecientes al clado 7. Por otro lado, la caracterización molecular de estos segmentos ha determinado que las dos muestras de Uruguay son resistentes a los adamantanos y sensibles al tratamiento con oseltamivir, a pesar del continuo aumento de cepas resistentes para este último antiviral.

## **2. INTRODUCCION**

## 2.1 CLASIFICACION Y NOMENCLATURA

Los virus de la influenza forman parte de la familia *Orthomyxoviridae*, la cual comprende cinco géneros: virus Influenza A (VIA), virus Influenza B (VIB), virus Influenza C (VIC), Thogotovirus y los Isavirus (Palese y Shaw. 2007). De acuerdo a las características antigénicas de la proteína de matriz o la proteína no estructural, los virus influenza son clasificados en 3 serotipos: A, B y C, solo los tipos A y B ocasionan frecuentemente enfermedades severas en humanos (Slemons y cols. 1974). Es importante destacar que existen identificados al día de hoy múltiples subtipos de VIA caracterizados por la combinación de los dieciséis genes que codifican para la proteína de membrana Hemaglutinina (HA) y los nueve genes que codifican para la glicoproteína de superficie Neuraminidasa (NA) (Fouchier y cols. 2005; Gamblin y cols. 2010; Tang y cols. 2010). Todos los subtipos de HA y NA se han encontrado en aves acuáticas, mientras solo seis HA y dos NA infectan a humanos de manera regular (Webster y cols. 1992). Los VIA, VIB y VIC presentan pequeñas diferencias en cuanto a la estructura y organización genómica y debido a que este trabajo se centra en los VIA se detallaran las características de este último.

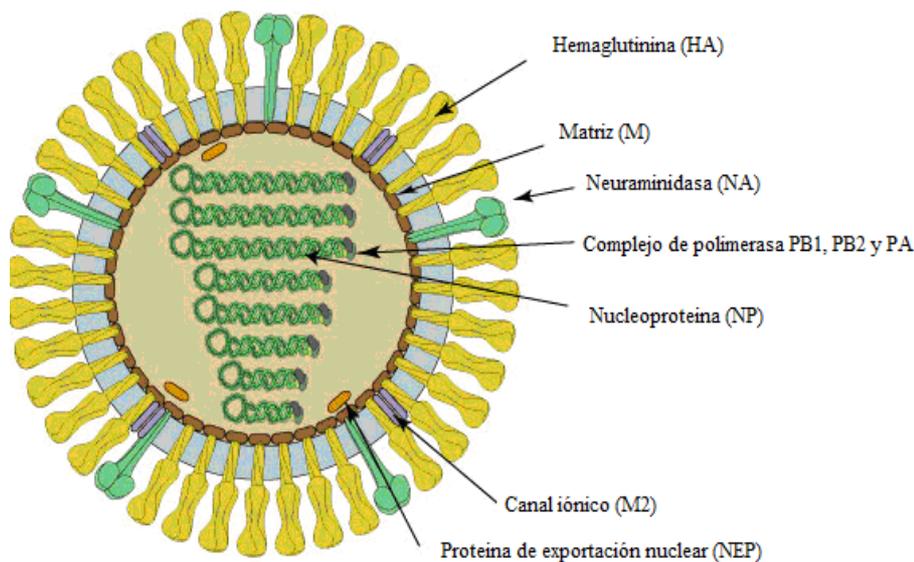
Los virus de la influenza se denominan taxonómicamente por un acrónimo en el que se incluye en primer lugar el tipo de virus gripal A, B o C, indicándose a continuación el hospedador animal en el que se ha aislado, si la cepa no es de origen humano. Posteriormente se incluye el origen geográfico de la cepa aislada, número de laboratorio de la cepa y año de aislamiento seguido entre paréntesis de la descripción antigénica del subtipo de HA y NA, (ver figura 1)



**Figura 1.** Nomenclatura de los virus de la Influenza A.

## 2.2 MORFOLOGIA Y ESTRUCTURA DEL VIRION

Los viriones de los VIA son pleiomorficos, y pueden ser tanto esféricos de aproximadamente 100 nanómetros (nm) de diámetro así como viriones filamentosos de 100nm de diámetro y más de 20nm de largo (Rossman y Lamb. 2011). La morfología de los viriones parece estar determinada por el segmento génico de matriz (M), aunque los genes HA y NP también contribuyen (Kawaoka 2001). La superficie más externa del virus está constituida por una envoltura lipídica la cual es adquirida de la membrana plasmática de la célula que ha infectado. Al microscopio electrónico, la envoltura aparece rodeada por unas espículas o proyecciones que corresponden a las dos glicoproteínas de superficie y mayoritarias en el virón: en los VIA estas son la HA y NA de 10 a 12 nm de largo (Kawaoka 2001), además los VIA poseen una tercera proteína integral de membrana, la proteína de canal iónico (M2) (Lamb y cols. 1985). Tanto HA, NA y M2 presentan diferentes estados de agregación, la HA se encuentra formando homotrimeros mientras que NA y M2 forman homotetrámeros. Tanto la HA como la NA están glicosiladas y contienen exclusivamente azúcares del tipo N-glicosídico (Gamblin y cols. 2010). Los tres polipéptidos de la envoltura son proteínas integrales de membrana, y tienen una región que se proyecta hacia el exterior del virión (ectodominio), una región transmembrana que atraviesa la envoltura y una región que se extiende hacia el interior de la partícula viral o cola citoplasmática. Por debajo de la envoltura viral la proteína de matriz (M1) le da estructura al virión y establece interacciones entre la membrana lipídica y el core interno de ribonucleoproteínas virales (RNPv). El core interno consiste en los ocho segmentos de ARN viral (ARNv) asociados a nucleoproteínas (NP) y al complejo de ARN polimerasa viral ARN dependiente compuesto por la polimerasa básica 1 (PB1), la polimerasa básica 2 (PB2) y la polimerasa acida (PA) (Rossman y Lamb. 2011). La proteína de exportación nuclear o proteína no estructural 2 (NEP/NS2) también se encuentra presente en el virión (Palese y Shaw 2007), (ver figura 2).



**Figura 2.** Diagrama esquemático de la estructura del VIA. Se observan proteínas integrales de membrana (HA, NA y M2). Por debajo se aprecia la proteína (M1). Los ocho segmentos genómicos de ARN se encuentran rodeados de las nucleoproteínas (NP) y asociados al complejo de ARN polimerasa viral (PB1, PB2 y PA). Se puede observar la presencia de la proteína no estructural (NEP). Extraído y adaptado de [http://viralzone.expasy.org/viralzone/all\\_by\\_species/6.html](http://viralzone.expasy.org/viralzone/all_by_species/6.html)

## 2.3 ORGANIZACIÓN GENOMICA

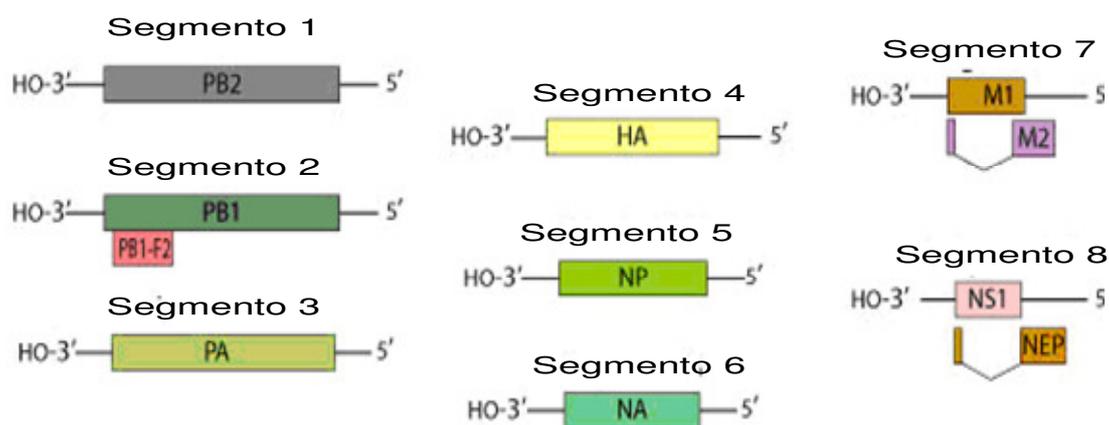
### 2.3.1 GENOMA

Los virus de la Influenza se caracterizan por poseer un genoma de ARN de simple hebra segmentado de polaridad negativa. El tamaño total del genoma es 13.600 nucleótidos (nt) para los VIA (Kawaoka 2001). Su genoma consta de ocho segmentos que codifican once polipéptidos (Palese y Shaw. 2007; Taubenberger y Kash. 2010).

La mayoría de los genes virales codifican una única proteína, mientras que en el caso del segmento génico M y NS codifican dos (Kawaoka 2001) (ver figura 3). En cada uno de los ocho segmentos del VIA, los primeros doce nucleótidos en el extremo 3' y los últimos trece en el extremo 5' están altamente conservados, son parcialmente complementarios y se encuentran asociadas entre sí y con el complejo de la polimerasa. Se han propuesto estructuras tipo “mango de sartén”, “tenedor” y “sacacorchos”, para la zona de interacción entre los extremos (Robertson 1979).

Dentro de la célula infectada se producen tres tipos de ARN de origen viral. Por un lado, los ARN mensajeros (ARNm), productos de la transcripción, poseen polaridad positiva, contienen en el extremo 5' una estructura de cap (nucleótido modificado de guanina (7 metil-guanosina)) y

10 a 13nt de origen no viral y en el extremo 3' de 17 a 22nt pero poseen una cola poly A. Por otro lado están los ARN<sub>v</sub>, que tienen polaridad negativa, producto de la replicación y se encapsidan en los viriones de la progenie y por último están los ARN copia (ARN<sub>c</sub>) que son copia exactamente complementaria de los ARN<sub>v</sub>, sin embargo no poseen cap ni cola poly A y se acumulan en el núcleo de la célula infectada, funcionando como molde para la síntesis de ARN<sub>v</sub> (Nayak 1994; Biawas y cols. 1998; Kawaoka 2001).



**Figura 3.** Organización genómica del virus Influenza A. Se muestran los 8 segmentos genéticos de polaridad negativa los cuales codifican para once proteínas virales (PB2, PB1, PB1-F2, PA, HA, NP, NA, M1, M2, NS1 y NS2). Si bien la mayoría de los segmentos genéticos codifica una proteína, los segmentos 7 y 8 dan lugar a dos proteínas por corte y empalme alternativo. Extraído y adaptado de [http://viralzone.expasy.org/viralzone/all\\_by\\_species/6.html](http://viralzone.expasy.org/viralzone/all_by_species/6.html)

Los segmentos de ARN<sub>v</sub> son capaces de codificar distintos tipos de proteínas encargadas de realizar diferentes funciones. Dentro de estas, se distinguen dos tipos, nueve proteínas estructurales y dos proteínas no estructurales. Las proteínas estructurales, están presentes en la partícula viral completa. Son proteínas virales: HA, NA, M, M2, NP y un complejo formado por las proteínas PA, PB1 y PB2. Las proteínas no estructurales, están presentes solamente en la célula infectada. Pueden aparecer en el núcleo como NS1, o en el núcleo y citoplasma como NS2. Su función es específica sobre el ARN celular, al que modifican funcionalmente para que dirija su proceso a la síntesis de proteínas virales (ver figura 3 y tabla 1).

### 2.3.2 POLIMERASAS

La polimerasa es un heterotrímero constituido por las subunidades PB1, PB2 y PA de 250 KDa, responsable de la replicación y transcripción del ARN<sub>v</sub> (Kawaoka 2001; Resa-Infante 2011). La subunidad PB2 está codificada por el segmento 1 de ARN<sub>v</sub> de 2341nt. Es una proteína de 759

aminoácidos (aa) que une y cliva el pre-ARNm celular con cap, posee actividad endonucleotídica y es necesaria para la iniciación de la transcripción viral, pero no para la síntesis del genoma de polaridad negativa ni el antígenoma de polaridad positiva los cuales no poseen 5' cap ni 3' cola poly A (Palese y Shaw. 2007; Resa-Infante 2011)

La subunidad PB1 está codificada por el segmento 2 de ARN de 2341nt, está constituida de 757aa. Constituye el núcleo del complejo y con ella interaccionan tanto PA a través del extremo N-terminal como PB2 a través del extremo C-terminal (Digard y cols. 1996; Resa-Infante 2011). La subunidad PB1 es la más conservada evolutivamente y posee varios motivos de secuencias características de ARN polimerasa ARN dependiente (Poch y cols. 1989), siendo la encargada de la iniciación y elongación del nuevo ARN sintetizado.

La proteína PB1-F2 ha sido descrita recientemente. Está codificada por un marco de lectura alternativo del segmento 2 del ARN. Su papel en la virulencia estaría relacionado con la inducción de apoptosis en células del sistema inmune, haciendo que la eliminación del virus sea menos eficaz (Chen y cols. 2001).

Por otro lado, la subunidad PA está codificada por el segmento 3 de ARN de 2233nt. Esta proteína compuesta por 716 aa es una fosfoproteína que tiene una actividad proteasa implicada en la replicación del ARNv. Esta subunidad proteica induce un proceso proteolítico que disminuye su propio nivel de acumulación así como de las otras proteínas del complejo, siendo la región N-terminal de ésta subunidad la responsable de la inducción de proteólisis. La ARN polimerasa está asociada con las nucleoproteínas y al ARN viral formando las denominadas RNPv uniéndose específicamente a secuencias conservadas en el extremo 5' y 3' presentes en los ocho segmentos de ARNv (Fodor y cols. 1994; Perales y cols. 2000).

### 2.3.3 HEMAGLUTININA

La HA, proteína de 566aa esta codificada por el segmento 4 de ARN de 1770 nt de longitud. Su nombre se debe a la capacidad de aglutinar eritrocitos por unión a los residuos de ácido siálico presentes en los receptores celulares. Las espículas de HA son de aproximadamente 14 nm por 4 nm, sobresaliendo de la superficie del virión. La HA desempeña dos funciones esenciales en la infección viral, es la responsable de la unión al receptor de ácido siálico en las cadenas de carbohidratos de las glicoproteínas o glicolípidos en la superficie de la célula susceptible y de la fusión de membrana viral y endosomal que determina la penetración de las RNPv en el citoplasma de la célula infectada (Palese y Shaw. 2007; Taubenberger y Kash. 2010).

La HA es un homotrímero constituido por subunidades idénticas, donde cada una contiene dos polipéptidos que se generan como resultado del clivaje a partir de un precursor HA0 (Kawaoka 2001; Gamblin y cols. 2010), sufriendo glicosilaciones co-traduccionales y remoción de una secuencia señal en el extremo N-terminal. HA0 es clivado por proteasas del hospedador en residuos conservados de arginina en 2 subunidades generando HA1 y HA2 unidas ambas por un enlace disulfuro. El clivaje de HA0 es un pre-requisito para que el virus sea infeccioso ya que es necesario para activar la fusión de la envoltura viral y la membrana del endosoma (Klenk y cols. 1975; Gamblin y cols. 2010) y por tanto es un determinante crítico en la patogenicidad y difusión de la infección (Steinhauer 1999).

HA es uno de los principales antígenos virales contra los que se dirigen los anticuerpos neutralizantes (Palese y Shaw. 2007). El reconocimiento de la HA por los anticuerpos está altamente correlacionado a los cambios conformacionales en los sitios antigénicos (epítopes) de la proteína. La mayor parte de los epítopes se concentran en la región HA1 de la proteína, la cual es la responsable de la antigenicidad. La HA tiene cinco epítopes variables (A, B, C, D y E), cada uno con aproximadamente veinte aminoácidos localizados en la superficie de la proteína. Los epítopes dejan entre sí un bolsillo estable (en el que se localizan residuos de aminoácidos esencialmente conservados entre las distintas cepas virales), el verdadero receptor viral, donde se asienta el ácido siálico celular (Paglini 1999). Este hueco es inaccesible a la unión por anticuerpos, pero las regiones circundantes están muy expuestas y constituyen las zonas inmunodominantes en la respuesta humoral del huésped. La región HA2 contiene la cola citoplasmática y la región hidrofóbica que permite el anclaje de la HA en la membrana. La exposición de la HA a bajos pH lleva a cambios conformacionales irreversibles que activan la capacidad de fusión del virus, permitiendo que el extremo N-terminal, altamente hidrófobo de la proteína HA2, ejerza su función de fusión de membrana y permita la entrada del virus a la célula. (Garten y Klenk. 1999).

#### 2.3.4 NUCLEOPROTEINA

La NP está codificada por el segmento 5 de ARN de 1565nt de longitud. Es una fosfoproteína de 498 aa, la principal proteína estructural y tiene múltiples funciones en el ciclo infeccioso del virus. Es una proteína básica, rica en arginina, glicina y serina con carga neta positiva a pH neutro (Biswas y cols. 1998; Palese y Shaw, 2007). Es el componente más abundante de las RNPv y es bastante conservada evolutivamente entre las diferentes cepas virales. La NP interacciona con el ARNv con una afinidad considerable pero sin ninguna especificidad de secuencia (Baudin y cols. 1994). La región más importante para esta interacción ha sido localizada en la secuencia N-terminal de la proteína (Albo y cols. 1995), pero la NP establece interacciones con el ARNv a través de residuos situados a lo largo de toda la molécula (Elton y

cols. 1999), donde cada monómero de NP interacciona con 20 nt (Baudin y cols. 1994). Además de estas interacciones típicas de una proteína que forma RNPv, la NP establece contactos específicos con la polimerasa a través de sus subunidades PB1 y PB2 (Biswas y cols. 1998). La NP posee señales carioplílicas (afinidad por el núcleo) para la translocación al núcleo y con el complejo de polimerasas juega un rol crítico durante la translocación nuclear de las RNPv, estando también implicada en el cambio desde la transcripción a la replicación (Krug y cols. 1989). Tarde en la infección migra al citoplasma, presumiblemente como componente de las RNPv (Neumann y cols. 1997). Las RNPv también interactúan con la proteína M1 la cual juega un papel fundamental en el proceso de brotamiento (Avalos y cols. 1997).

### 2.3.5 NEURAMINIDASA

La proteína NA está codificada por el segmento 6 de ARN de 1413nt. Es una glicoproteína de superficie celular de clase II de 1413 aa, se ensambla formando tetrámeros a partir de subunidades idénticas. Poseen una señal hidrofóbica en la región N-terminal sin clivar como dominio de anclaje a la membrana, una cola citoplasmática, cuyos aminoácidos están conservados en todos los subtipos VIA, y una cabeza que sobresale en forma de “caja”. Cada monómero de NA muestra una hendidura central profunda en su superficie (sitio activo de la enzima que presenta aminoácidos conservados entre las distintas cepas virales). Se han identificado cuatro sitios antigénicos en el VIA, cada uno consistiendo en múltiples epítopes contra los que se dirige la respuesta humoral neutralizante (Kawaoka. 2001; Gamblin y cols. 2010).

La NA posee actividad sialidasa, rompiendo enlaces químicos entre el ácido siálico y las glicoproteínas o glicolípidos que se encuentran en las membranas celulares. Esta proteína es necesaria para la liberación de los nuevos virus formados ya que de otra forma no serían liberadas, sino reabsorbidas inmediatamente después del brotamiento o se agregarían entre sí, Es por esto que la NA tiende a localizarse en la región de la envoltura donde la partícula viral brotante se separa de la membrana celular (Colman y cols. 1983; Webster y cols. 1984; Palese y cols. 1974; Palese y Shaw, 2007).

### 2.3.6 MATRIZ

La proteína M1 de 252 aa es la proteína más conservada del virus, es codificada por el segmento 7 de ARNv de 1027nt de longitud. Se encuentra por debajo de la membrana plasmática dándole la estructura a la partícula viral y constituye la proteína más abundante del virión. Una de las superficies de la misma está fuertemente cargada positivamente (Sha y Leu. 1997) y es probablemente responsable de su unión a ARNv, mientras que la superficie opuesta es

hidrofóbica y sería responsable de la interacción con la membrana (Nayak y cols. 2004; Rossman y Lamb 2011). Esta proteína se sintetiza y permanece en el citoplasma hasta etapas tardías de la infección donde es requerida en el núcleo para exportar las RNPv hacia el citoplasma ya que posee una señal de localización nuclear. Se ha descrito que una importante modificación post-traducciona en la M1 es la responsable de regular la replicación viral en las etapas de maduración viral y ensamblaje. Los virus con defectos en estas modificaciones inducen un bajo título y las proteínas virales y ARNv se acumulan en la célula, además esto se requiere para la adecuada interacción entre M1 y las RNPv, impidiendo la exportación nuclear de éstas y la morfogénesis viral posterior (Wu y cols. 2011).

La proteína M2 de 96 aa está codificada por un ARNm generado por corte y empalme donde se retienen 51 nt del extremo 5' y 271 nt del extremo 3' del segmento 7, liberando un intron de 689 nt. M2 es una proteína integral de membrana tipo III. La proteína M2 está relacionada al radio de la forma esférica y filamentosa de la partícula viral (Roberts y cols. 1998), además de estar relacionada al ensamblaje y brotamiento (Schroeder y cols. 2005). Se expresa de forma abundante en la membrana plasmática de las células infectadas, junto con la HA y NA, sin embargo, esta poco expresada en la superficie del virón (Lamb y cols. 1985). La forma biológicamente activa de la proteína es un tetrámero en el que los monómeros están unidos por puentes disulfuro por su zona N-terminal (Holsinger y Lamb. 1991). Las regiones transmembrana de los monómeros forman un canal iónico el cual se activa a pH ácido y es fuertemente selectivo para protones (Mould y cols. 2000), siendo el responsable de la liberación de RNPv al citoplasma. El canal iónico se puede inhibir con amantadina, un antiviral específico para los VIA, que tiene como blanco el dominio transmembrana de esta proteína (Hay y cols. 1985; Neumann y cols. 2009).

### 2.3.7 PROTEINA NO ESTRUCTURAL

La proteína NS1 está codificada por el segmento 8 de 890 nt, a partir del transcrito primario y la proteína NS2 a partir del transcrito procesado, que dan lugar a proteínas de 230 y 121 aa respectivamente (Palese y Shaw. 2007).

La NS1 es una proteína no estructural, posee dos dominios funcionales, un dominio N-terminal de unión al ARNv y un dominio C-terminal efector, el cual media interacciones con proteínas de la célula huésped y estabiliza el dominio de unión al ARNv. La NS1 forma homodímeros y la dimerización es importante para la unión al ARNv (Hale y cols. 2008). Contiene dos señales de transporte al núcleo y además presenta una señal de exportación nuclear (Li y cols. 1998). Se expresa en periodos tempranos de la infección viral, momento en el que se localiza esencialmente en el núcleo (Portela y cols. 1985), mientras que a tiempos posteriores se localiza

en citoplasma celular asociándose a polisomas (Falcon y cols. 1999). Actúa regulando el procesamiento de ARNm del huésped como el corte y empalme y la exportación nuclear, facilita la traducción de ARNm virales. NS1 está relacionada a la inhibición de la respuesta inmunitaria del huésped, sobre todo en la limitación de la producción del interferón (INF), por inhibir su señalización (Jia y cols. 2010) y el efecto antiviral de las proteínas inducidas por este último, como la proteína quinasa dependiente de RNAs (PKR) y 2'5'oligo A sintetiza/ RNAsa L (Yuan y Krug. 2001; Dauber y cols. 2004; Hale y cols. 2008). La NS1 también inhibe la activación de células dendríticas, facilitando al virus establecer una infección (Fernández Sesma. 2007). Haye y colaboradores (2009) han demostrado que VIA humanos mutantes con la región C-terminal de la proteína NS1 truncada son suficientes para producir atenuación y más inmunogenicidad, sugiriendo su potencial uso como una vacuna a virus vivos contra la Influenza en los seres humanos (Haye y cols. 2009).

La proteína NS2 se asocia con las RNPv a través de la interacción con la región C-terminal de la proteína M1. Tiene como función principal la exportación de RNPv desde el núcleo al citosol a través de la interacción con NP y con el factor de exportación nuclear CRM1 (Neumann y cols. 2000). Es sintetizada de forma tardía en la infección y empaquetada en los viriones luego del transporte núcleo-citoplasmático.

Gen	Longitud nt	Proteína	Tamaño aa	Función
1	2341	PB2	759	Transcriptasa
2	2341	PB1	757	Transcriptasa. Elongación
3	2233	PA	716	Transcriptasa. Proteasa
4	1770	HA	566	Hemaglutinina. Unión al receptor y fusión de membranas en penetración viral.
5	1565	NP	498	Nucleoproteína. Unión a ARN. Parte del complejo de transcriptasa. Transporte nuclear/citoplasmático de ARN viral
6	1413	NA	454	Neuraminidasa: Rompe unión entre HA y el receptor para la liberación de nuevas partículas virales.
7	1027	M1 M2	252 96	M1: proteína matriz. componente principal del virión. Interacción entre RNPv y envoltura viral. M2: proteína integral de membrana. Canal iónico en la penetración viral.
8	890	NS1 NS2	230 121	NS1: proteína no estructural. Sólo en núcleo de células infectadas. Efecto sobre transporte, división y traducción de ARN celular. Antagonista del INF. NS2: proteína no estructural. Núcleo y citoplasma Celular. Transporte de nucleocapside hacia la membrana citoplasmática junto a M1.

**Tabla 1.** Segmentos génicos y proteínas codificadas por el virus Influenza A H1N1. En la tabla se puede observar el tamaño en nt de cada segmento génico del genoma de Influenza A H1N1, el nombre de cada uno de las proteínas codificadas por éstos, el tamaño en aminoácidos, y su función.

## 2.4 CICLO REPLICATIVO

### 2.4.1 ADSORCION Y PENETRACION

El primer paso en la multiplicación viral es la unión del virus al receptor en la célula susceptible. Los virus de aves y equinos se unen preferentemente a receptores que contienen a la galactosa unida por enlaces  $\alpha$  (2,3) mientras los virus humanos se unen a receptores con terminaciones  $\alpha$  (2,6) (Rogers y Paulson.1983; Gamblin 2010). La penetración del virus a la célula susceptible se realiza por endocitosis mediada por receptor a través de vesículas revestidas por clatrina. El bajo pH dentro de la vesícula causa una alteración de la conformación de la HA previamente clivada, lo que conduce a la exposición del extremo amino hidrofóbico de la subunidad HA2 (fusogénica). Esto provoca la fusión de la envoltura viral con la membrana

plasmática del endosoma, y permite la liberación de las RNPv al citoplasma (Stegmann y cols. 2000). El descenso de pH también activa el flujo de protones desde el endosoma al interior de la partícula, a través de la proteína M2. La activación de M2 induce la baja de pH en el interior de la partícula viral permitiendo la desestabilización de las interacciones entre las RNPv y la M1 (Lamb 1994). Estas interacciones proteína-proteína deben eliminarse ya que la proteína M1 inhibe la entrada de la RNPv al núcleo por enmascarar la señal de localización nuclear (Bui y cols. 1996).

A diferencia de la mayoría de los virus ARN, éstos transcriben y replican en el núcleo ya que necesitan los 5'cap de los pre-ARNm celulares y la maquinaria de splicing. Luego de la penetración los complejos de RNPv migran hacia el núcleo y entran por transporte activo. NP, PB1, PB2 y PA poseen señales de localización nuclear, sin embargo, la señal de localización nuclear en la NP es necesaria y suficiente para la entrada al núcleo (Weber y cols. 1998; Cros y Palese. 2003).

#### 2.4.2 TRANSCRIPCIÓN Y TRADUCCIÓN

Durante la transcripción las cadenas de ARN de polaridad negativa son copiadas a moléculas de polaridad positiva usando los 5'cap de los pre-ARNm celulares como cebador a través de un proceso conocido como secuestro de cap (Blass y cols. 1982; Resa-Infante. 2011). Las secuencias son poliadeniladas en el extremo 3' del ARNm por pasajes sucesivos del complejo de polimerasas por un tracto de oligo U en el molde de ARNv (Robertson y cols. 1981), generando los ARNm que darán origen a las proteínas virales.

La mayoría de los ARNm son traducidos por ribosomas libres en el citoplasma, siendo los ARNm de M y NS procesados por “corte y empalme” antes de salir del núcleo. En cambio, los ARNm de HA, NA y M2 son traducidos por ribosomas unidos al retículo endoplasmático, pasan a la vía secretoria para sufrir modificaciones post-traduccionales. La HA sufre clivaje proteolítico por las enzimas del huésped durante el pasaje por el trans golgi, proceso necesario para que las partículas liberadas sean infecciosas (Klenk y cols. 1975; Gamblin y cols. 2010).

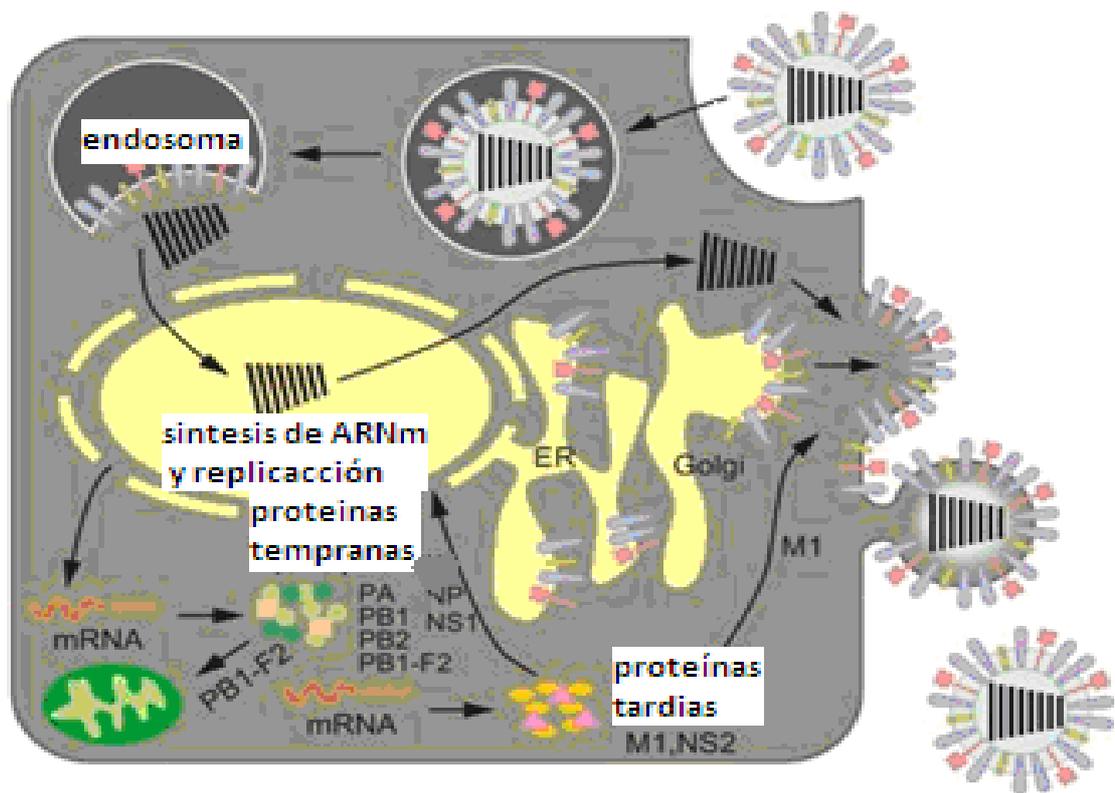
#### 2.4.3 REPLICACIÓN

La replicación del ARNv permite la síntesis de ARN copia (ARNc) y de ARNv por un mecanismo diferente al de la transcripción. La replicación es independiente de la iniciación con cebador y no requiere de la adición de cola poly A en el extremo 3'. La replicación ocurre en dos pasos, primero se sintetiza ARNc de polaridad positiva y luego este intermediario de replicación sirve como molde para la síntesis de ARNv de polaridad negativa. La NP constituye

la señal que dirige el cambio desde la transcripción hacia la síntesis de ARNc y ARNv por la ARN polimerasa. La unión de esta proteína al ARNv causa la anti terminación y permite leer a través del recto de poly U en el molde de ARNv ya que la presencia de 5'cap durante la transcripción evita la unión de NP al ARNv naciente, evitando la anti terminación del ARNm (Palese y Shaw. 2007).

#### 2.4.4 ENSAMBLAJE Y BROTIAMIENTO

Luego de la replicación los nuevos complejos de RNPv se ensamblan en el núcleo para exportarse al citoplasma. Primero las proteínas PA, PB1, PB2, PA y NP son enviados al núcleo para formar las nuevas RNPv junto al ARNv recién sintetizado. Luego de la síntesis en el citosol, la entrada al núcleo de M y NS2 es esencial para la migración de las RNPv fuera del núcleo para el ensamble de la progenie viral en el citoplasma (Cros y Palese. 2003). El modelo actual para la exportación esta mediada por NS2 la cual interactúa con RNPv a través de M1, de la misma forma que con el receptor de exportación CRM1 y varias nucleoporinas para formar un complejo de exportación. Aunque la señal de exportación nuclear de NS2 no afecta la unión directa con CRM1 su alteración evita la formación del complejo ternario con Ran GTP, resultando en la retención de las RNPv en el núcleo (Neumann y cols. 2000). Durante el ensamblaje, HA, NA, y M2 se dirigen a la región apical de la membrana plasmática y a la vez, las regiones transmembrana de HA y NA contienen señales de asociación con balsas lipídicas (Zhang y cols. 2000). Las balsas lipídicas funcionan como micro dominios para la concentración de glicoproteínas virales, formando los sitios de ensamblaje, estando HA y NA asociadas excepto M2 (Chen y cols. 2007; Rossman y Lamb. 2011). La proteína M1 se une a las colas citoplasmáticas de HA y NA y genera un cambio de conformación que le permite polimerizar. La HA parece tener la habilidad de alterar la curvatura de la membrana, permitiendo la iniciación del proceso de brotamiento, siendo la eficiencia del proceso aumentada con la unión de M1. La unión de M1 recluta a las RNPv a través de la unión a NP y media el reclutamiento de M2 al sitio de brotamiento siendo muy importante para completar el proceso (Rossman y Lamb. 2011). De esta forma los viriones adquieren envoltura y sufren maduración a medida que van brotando de la membrana celular huésped. La etapa final es la liberación de la progenie viral al exterior celular por brotamiento (Nayak y cols. 2004). Los viriones recién sintetizados tienen en su superficie glicoproteínas que contienen ácido siálico como parte de su estructura de carbohidratos, y por tanto son vulnerables a auto-aglutinación por la hemaglutinina. La principal función de la neuraminidasa viral es la remoción de esas partículas (Laver y cols. 1999; Palese y Shaw. 2007; Rossman y Lamb. 2011), (ver figura 4).



**Figura 4.** Diagrama del ciclo replicativo del virus de la Influenza A. Una vez unido a la superficie celular el virus es internalizado por endocitosis mediada por receptor. El endosoma acidificado desencadena la fusión de la membrana endosomal y viral, liberando las RNPv al citoplasma. Estas últimas son transportadas al núcleo donde se produce la transcripción y la replicación. Nuevas RNPv son exportadas del núcleo para su ensamblaje en la región apical de la membrana plasmática, desde donde brotan y son liberadas. Extraído y adaptado de (Kawaoka 2001)

## 2.5 MECANISMOS DE VARIABILIDAD GENÉTICA

Los VIA adquieren un alto nivel de variabilidad genética debido a su alta tasa de replicación en las células infectadas, la alta tasa de error de la ARN polimerasa ARN dependiente responsable de introducir mutaciones puntuales, la falta de actividad correctora de errores (Duffy y cols. 2008), y al proceso de reordenamiento génico. Además existe una fuerte presión de selección para evadir la respuesta inmune del hospedero, así como para evadir la acción de los antivirales (Smith y cols. 2004; Gamblin y cols. 2010; Bloom y cols. 2010).

La variación antigénica se genera por dos procesos fundamentales:

1) La deriva antigénica, es el proceso que resulta de la generación y fijación selectiva de mutaciones principalmente en el gen que codifica para la HA, el principal blanco de la respuesta inmune del huésped. Las variantes que mejor escapan a la respuesta inmune del huésped son la

que tienen ventajas replicativas significativas (De Jong y cols. 2000; Hillerman 2002; Taubenberger y Morens. 2010).

2) El salto antigénico, es considerado la mayor fuerza evolutiva en la evolución del VIA. El reordenamiento génico es un tipo de recombinación a través de la cual virus del mismo o diferente subtipo co-infectan una célula e intercambian segmentos de ARN para formar un nuevo virus, siendo los virus parentales de diferentes huéspedes susceptibles. La alta probabilidad de sufrir reordenamientos génicos se debe a la segmentación de su genoma, contribuyendo a la gran variabilidad, particularmente en los antígenos HA y NA de los VIA (De Jong y cols. 2000; Hillerman 2002). El salto antigénico ocurre cuando el virus adquiere una HA o NA perteneciente a un subtipo de VIA diferente, mediante este proceso. Estos constituyen cambios mayores en la estructura de los antígenos de superficie lo que produce subtipos completamente nuevos de virus ante los cuales la población tiene poca inmunidad o ninguna (McHardy y Adams. 2009). Nuevas pandemias de virus de la Influenza A pueden emerger a través de este proceso de reordenamiento génico con cepas de reservorios aviáres o suínos (Taubenberger y cols, 2006).

A pesar de ser el reordenamiento el principal factor de salto antigénico, la recombinación podría estar jugando un papel importante. Se ha descrito una sola vez la recombinación clásica en donde un segmento de ARN del virus de la influenza contiene material genético de dos virus parentales distintos y se presume sea una forma extremadamente rara de intercambio de información genética entre virus de la Influenza. El entendimiento de la dinámica evolutiva de los VIA es de gran importancia para su control y vigilancia. Otros procesos, junto a la deriva antigénica, juegan roles importantes en la evolución viral como, la co-circulación de cepas genéticamente diferentes, frecuentes eventos de reordenamiento intra-subtipo y periódicos “barridos selectivos del genoma” ocasionados por la selección natural (Holmes y cols. 2005; Nelson y cols. 2006; Memoli y cols. 2009). La evolución continua es más prominente en las glicoproteínas de superficie, pero también ocurre en cada uno de los restantes seis genes internos de los virus de la influenza.

## 2.6 ECOLOGÍA DE LOS VIRUS DE LA INFLUENZA A

A diferencia de los VIB y VIC, los cuales están restringidos principalmente a humanos, los VIA poseen una ecología más compleja involucrando varias especies de huéspedes (Wright y cols, 2007). Los VIA están ampliamente distribuidos en la naturaleza en diferentes especies de animales tanto aviares como mamíferos, siendo las aves acuáticas su reservorio natural (Webster y cols.1992; Taubenberger y cols. 2010). La mayoría de las aves acuáticas migratorias se infectan de forma asintomática por VIA, multiplicándose éste en las células de su epitelio intestinal y eliminándose en las heces en cantidades abundantes (Wright y cols. 2007). Este mecanismo de transmisión oral-fecal es absolutamente distinto a las transmisiones interhumanas de los virus de la Influenza. La naturaleza no virulenta de la infección por virus de la Influenza aviar sería el resultado de la adaptación del virus a su hospedero cientos de años, creando así un reservorio que asegura la continuidad del virus. Desde este reservorio el virus puede pasar a mamíferos u otros animales domésticos, incluidas las aves, que actuarían como hospederos intermediarios en los que podrían tener lugar fenómenos de recombinación o reordenamiento genético. Este paso por los hospederos intermediarios facilita sin duda la adaptación de un virus de origen aviar a los mamíferos, sin embargo, sólo un número limitado de éstos ha sido capaz de propagarse y circular de forma estable en ellos. Las aves pueden ser infectadas con todos los subtipos de HA y NA, mientras que solo seis HA y dos NA infectan a humanos de forma regular (Webster y cols. 1992; Taubenberger y Kash. 2010). La transmisión inter-especie de los VIA es un hecho comprobado, pero la adaptación al hospedador es un paso decisivo para continuar la difusión intra-especie de los virus que hacen el salto de especie. Los cerdos pueden servir como "recipientes de mezcla" para la generación de virus reordenantes, ya que receptores humanos y aviares fueron identificados en la tráquea de cerdos, proporcionando un entorno propicio para la replicación viral y el reordenamiento génico.

### 2.6.1 EPIDEMIAS

Una de las características más importantes en la epidemiología de los VIA es su capacidad de producir epidemias anuales y raramente pandemias. Las epidemias anuales están relacionadas a la disminución de la inmunidad frente a los sitios antigénicos en la superficie de las glicoproteínas HA y NA debido al proceso de deriva antigénica. Cada año las nuevas variantes desplazan a las más viejas (Boni 2008; McHardy y Adams. 2009). Las variantes antigénicas emergentes juegan un rol importante en la morbi-mortalidad por infecciones del tracto respiratorio. Las epidemias ocurren prácticamente cada año, pero varían en intensidad. Durante los meses más fríos del año en las zonas de clima templado, causan considerable morbilidad en todos los grupos etarios (OMS 2009a).

### 2.6.2 PANDEMIAS

Las pandemias ocurren a intervalos impredecibles y se caracteriza por la presencia de brotes en todo el mundo, surgen como consecuencia de reordenamientos génicos y transmisión inter-especie, donde un nuevo subtipo de virus de la Influenza aparece y ante el cual la población mundial posee poca o ninguna inmunidad. Estas son generalmente peores cuando existen cambios significativos en los principales antígenos de superficie del virus. Solo los VIA han causado pandemias y se restringieron a tres subtipos de HA (H1, H2 y H3) y dos de NA (N1 y N2), y en la actualidad los subtipos H3N2 y H1N1 continúan circulando mayoritariamente en el hombre (Neumann y cols. 2009). Los VIA causaron las últimas 4 pandemias más relevantes: 1918, 1957, 1968 y 2009, todas ellas a causa de eventos de reordenamiento inter-subtipo (Garten y cols. 2009).

Muchos de estos brotes parecen haber comenzado en Asia, más probablemente en China (Patterson 1986). Debido a la proximidad entre los humanos y sus animales domésticos ha sido considerado una zona ideal para la generación de cepas pandémicas, que luego se transmiten al resto del mundo (Webster y cols. 1992; Rambaut y cols. 2008; McHardy y Adams. 2009). Esta es la región geográfica que tiene que ser estudiados con mayor intensidad en busca de virus emergentes, tal vez teniendo una influencia importante en el diseño de vacunas. Saber donde estas cepas se generan cada año podría acelerar el proceso de elección de la cepa de VIA a ser incorporados en la vacuna (Holmes 2009).

### 2.6.3 HISTORIA EVOLUTIVA DEL VIRUS DE LA INFLUENZA A SUBTIPO H1N1

Los VIA del subtipo H1N1 han circulado en dos períodos diferentes en los últimos cien años y han tenido un gran impacto epidemiológico en humanos. El primer período fue entre 1918 y 1957 y el segundo desde 1977 hasta el día de hoy. Se han producido tres pandemias en los últimos cien años (Taubenberger y Morens. 2010): en 1918 (subtipo H1N1) (Smith y cols. 2009), en 1957 (subtipo H2N2) (Scholtissek y cols.1978), y en 1968 (subtipo H3N2) (kawaoka y cols. 1989). Durante cada una de estas pandemias, el nuevo virus pandémico ha remplazado el subtipo anterior dejándolo fuera de circulación (Wolf y cols. 2006).

a) Gripe Española: En 1918/1919 un virus de influenza A/H1N1 humano de origen aviar generó la pandemia de mayor impacto desastrosos de la historia, denominada gripe española, causando la muerte de 50 millones de personas. La pandemia de 1918 produjo tres olas epidémicas: Una inicial, más benigna, transcurrió durante la primavera de 1918, seguida de dos olas de mayor letalidad en el otoño e invierno de 1918 y 1919 respectivamente. En su mayoría, la gente que murió durante la pandemia lo hizo por neumonía causada por bacterias oportunistas

que infectaron a quienes la gripe ya había debilitado. La capacidad del virus 1918 para producir una grave alteración del tracto respiratorio, superior y/o inferior, induce a pensar que tenía altas tasas de replicación y de dispersión célula-célula. Se sabe que la proteína viral NS1 impide la síntesis del INF tipo I, un mecanismo de defensa inmune contra la infección y por lo tanto la gran virulencia asociada a este virus se pudo deber a la gran efectividad en el bloqueo de la síntesis del INF tipo I (García-Sastre 1998; Basler y cols. 2001). Esta pandemia mató principalmente a adulto jóvenes entre 20 y 40 años, pese a que las víctimas de gripe en general se ubican entre menores de 2 años y personas de la tercera edad. El virus H1N1 circuló en la población humana desde 1918 hasta 1957. Durante ese periodo de tiempo la cepa H1N1 continuó circulando en humanos, causando epidemias estacionales de variada severidad y también en poblaciones de cerdos, como Influenza clásica de origen porcino (Taubenberger y Kash. 2001).

b) Gripe asiática: En 1957 la cepa A H1N1 desapareció y fue sustituida por la cepa pandémica H2N2 (Scholtissek y cols. 1978) que apareció bruscamente en el sureste de China. Este virus se originó por un evento de reordenamiento entre cepas humanas y aviares, en donde se introdujo la H2 y N2 de origen aviar a la población humana (Kawaoka y cols. 1989; Taubenberger y Kash. 2010), generando una pandemia denominada gripe asiática. Una primera ola epidémica estuvo asociada a extensa morbilidad e incrementos bruscos de la mortalidad. Una segunda ola de igual o más severidad surgió en enero del año 1958. Los más susceptibles fueron niños pequeños y ancianos causando, 70.000 muertes (Glezen 1996).

c) Gripe de Hong Kong: En el año 1968 se generó un nuevo virus humano de origen aviar subtipo H3N2 pandémico causante de la gripe de Hong Kong. La nueva pandemia se originó de nuevo en China. En una primera fase, la pandemia se extendió a los países vecinos. La pandemia fue considerada poco severa. El virus fue generado por reordenamiento génico entre un virus humano H2N2 y uno de origen aviar, introduciendo a la población humana la H3 y PB1 de origen aviar (Taubenberger y Kash. 2010).

En 1977, la cepa A H1N1 reapareció en China luego de 20 años de ausencia siendo los más vulnerables a la enfermedad niños y adultos jóvenes, mientras que los adultos mayores que estuvieron expuestos a la enfermedad antes de 1957 estaban protegidos contra la influenza. Análisis de secuencias de cepas H1N1 mostraron que había gran similitud genética y antigénica entre la HA de los virus que circularon a principio de 1950 (Nakajima y cols. 1978; Scholtissek y cols. 1978). Este virus no desplazó el virus H3N2. Comparaciones realizadas por Nelson y colaboradores (2008), de secuencias de VIA H1N1 que circularon entre 1918 y 2006 evidenciaron notablemente que las cepas aisladas de 1947 y 1950 mostraban eventos de reordenamiento intra-subtipo, principalmente en los genes HA y NA. Las secuencias obtenidas

para el gen de la HA mostraron gran similitud con cepas H1N1 que circularon más adelante en el tiempo, mientras que las secuencias del gen de la NA evidenciaron estar relacionadas a cepas H1N1 que circularon en años previos a 1947 y 1950. Si bien el gen de la HA mostraba grandes variaciones, el gen de la NA se mostraba más conservado (Nelson y cols. 2008). Eventos de reordenamiento de genes intra-subtipo es un factor importante en la evolución a largo plazo de los VIA, ya que los múltiples segmentos involucrados juegan un rol importante en la generación de cepas epidémicas, fenómeno recientemente demostrado también en virus de la influenza A H3N2 (Holmes y cols. 2005).

Los VIA subtipo H1N1 y H3N2 han circularo en la población humana por varias décadas, de estos dos subtipos, H3N2 evoluciona más rápidamente y ha sido el causante de la mayoría de las infecciones (Rambaut, y cols. 2008). Sin embargo en abril del 2009 un nuevo virus H1N1 pandémico (H1N1 pdm), de origen porcino lejanamente relacionado a la cepa H1N1 circulante ganó lugar en la población humana. La emergencia de este virus inicio la primer pandemia del siglo XXI (Neumann y cols. 2009; Garten y cols. 2009).

El nuevo subtipo de VIA H1N1 pdm, reportado desde México y Estados Unidos rápidamente se esparció globalmente. En la región sudamericana los primeros casos se detectaron en Mayo de 2009, y para el 11 de junio 2009 la Organización Mundial de la Salud (OMS) declara alerta por pandemia en fase 6 (OMS 2009a). Enfermedades relacionadas a la gripe alcanzaron el punto máximo desde octubre a noviembre del 2009. Para mayo del 2010, 214 países tenían casos reportados, con más de 18.090 muertes entre los casos confirmados por laboratorio reportados a la OMS (OMS 2010a; Jhung y cols. 2012). Para agosto del 2010 el virus H1N1pdm se había desplazado al periodo post pandémico (OMS 2010a) y durante la temporada 2010/2011 el virus de la Influenza A H3N2 ha sido el serotipo predominante, pero el virus H1N1 del 2009 continuo co-circulando con H3N2 y con el virus de la influenza B.

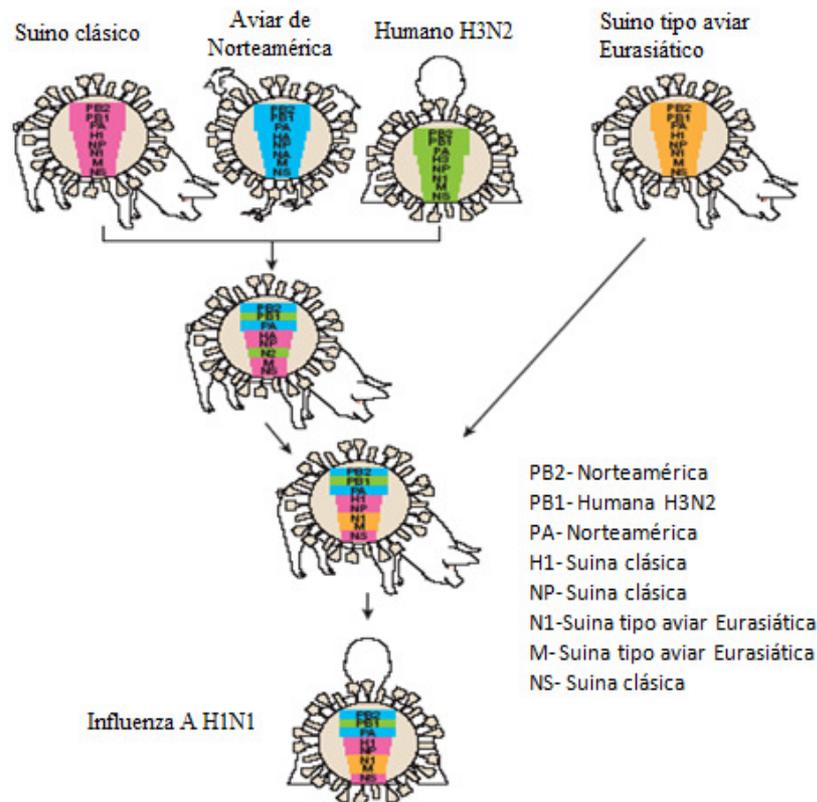
Un grupo de investigación del VIA (H1N1) de origen porcino, 2009, revelaron que este nuevo virus se generó a partir de un triple reordenamiento entre el virus de origen aviar, suino y humano. Se generó un reordenamiento entre virus de origen suino de Norteamérica, (los cuales habían sido generado por triple reordenamiento y circula desde 1997 en la población de cerdos de Norteamérica) con un virus suino de tipo aviar de Eurasia, (el cual fue introducido en esta población de cerdos a partir de un virus aviar en 1979 (Pensaert y cols. 1981). Estos estudios revelaron que los segmentos PB1, PB2, PA, HA, NP y NS muestran un gran parecido con los VIA H1N2 generados por triple reordenamiento, aislados de cerdos a fines de 1990 en Norteamérica. En cuanto a los segmentos NA y M de los nuevos virus H1N1 están relacionados con cerdos de Europa. Se pudo determinar que el nuevo virus H1N1pdm posee los genes PB2 y PA de virus de origen aviar de Norteamérica, PB1 de virus H3N2 de humanos y HA, NP y NS de virus suinos clásicos H1N1 y los genes NA y M de virus de origen porcino de Eurasia, (ver

figura 5) (Novel Swine-Origin Influenza A (H1N1) Investigation Team 2009; Smith y cols. 2009; Trifonov y cols. 2009; Mamun y Hude. 2010).

Este nuevo virus pandémico no posee marcadores asociados con alta patogenicidad. Ciertos marcadores moleculares específicos para la predicción de la adaptación a humanos se hallaron ausente en el virus de la pandemia H1N1 2009, lo que sugiere que, determinantes moleculares no reconocidos aun podrían ser responsables de la transmisión entre humanos (Garten y cols. 2009). Otros estudios donde han comparado la secuencia génica de HA de este virus con las de virus de la Influenza pandémicos anteriores, han revelado que marcadores específicos que determinan la transmisión eficientes de estos virus entre humanos se encuentran en el nuevo virus H1N1 (Neumann y cols. 2009; Chen y Shih. 2009).

Un estudio reciente revela que la diversificación temprana del virus pandémico H1N1 con cepas desde el 1 de abril del 2009 al 9 de julio del 2009, basados en el concatenamiento del genoma resulto en 7 linajes, los cuales muestran patrones espaciales definidos, (ver figura 6). Cambios de aminoácidos se han fijado en cada clado excepto para el clado 3 y en todos los segmentos genómicos excepto en el gen M (Nelson y cols. 2009). Con excepción del clado cuatro, el cual contiene aislados de Asia, todos los demás están geográficamente dispersados y parecen co-circular en tiempo y espacio. El clado uno incluye la primer cepa H1N1pdm aislada A/California/04/2009. En un análisis realizado por Nelson y colaboradores (2009) identificaron que el tiempo del ancestro común para este clado era entre el 16 de febrero y 16 de marzo del 2009, siendo la primera cepa en emerger que circulo 2 a 6 semanas de la detección inicial. Los cambios detectados para este clado fueron S224P en PA y S91P, A200T y V323I en HA. Para el clado dos el análisis del tiempo del ancestro común más cercano data del mismo tiempo que el clado uno. A diferencia del clado uno, este se expandió geográficamente. Durante la caracterización molecular se han detectado dos sustituciones de aminoácidos M581L en PA y T373I en NP. El clado tres fue detectado más tarde que los anteriores, sin embargo según los análisis de TMRCA emergió en el mismo momento. En este caso ningún cambio de aminoácido ha sido fijado para todas las cepas pertenecientes al clado tres. Las cepas pertenecientes al clado cuatro provienen del este de Asia, su ancestro común más cercano es del 5 de marzo al 8 de abril del 2009, no siendo identificado hasta mayo de ese año. Los cambios de aminoácidos reportados fueron V649I en PB2, I667T en PB1, V100I en NP, V106I en NA, y E63K en NS2. Las primeras cepas del clado cinco fueron detectadas en Wisconsin el 28 de abril del 2009, y luego se ha dispersado hacia Canada, China, y Japón. Las cepas de este clado se caracterizado por cambios aminoacidicos V100I en NP y V106I y N248D en NA, siendo estos cambios también observados en el clado seis y siete (Nelson y cols. 2009; Potdar y cols. 2010). Además de los cambios en NP y NA, dos cambios característicos del clado fueron detectados K(-15)E y Q295H

en HA. El Clado siete es caracterizado por fijaciones de aminoácidos en NP V100I y V106I y N248D en NA, observados en el clado cinco y seis y además S206T en HA y I123V en NS1. Análisis filogenéticos han revelado que este ultimo clado fue el predominante en Sudamérica y el que circulo en Uruguay, aunque también hubo co-circulación con el clado cinco y seis (Goñi y cols. 2010).



**Figura 5.** Generación de los VIA H1N1pdm causantes de la pandemia 2009. A fines de 1990, ocurrieron eventos de reordenamiento entre cepas humanas A H3N2, cepas aviarias de Norteamérica y cepas de cerdos clásicas. A fines de 1990 resulto en una nueva cepa triple reordenante que circuló en poblaciones de cerdos en Norteamérica hasta la actualidad. Uno de estos virus triple reordenante se reordenó con un virus de cerdos de Eurasia, y generó la nueva cepa pandémica de origen porcino que ahora circula en humanos. (Extraído y adaptado de Neumann y cols, 2009).



## 2.7 LA ENFERMEDAD

La Influenza A o gripe es una enfermedad respiratorio altamente contagiosa diseminándose por aerosoles o por el contacto de persona a persona, siendo la principal causa de muerte respiratoria en humanos, resultando una mortalidad anual de 250.000 a 500.000 globalmente (Holmes 2009). El período de incubación del virus de la influenza es de uno a cuatro días, dependiendo en parte de la carga viral y del estado inmunitario del hospedador. Las células blanco primarias de los virus son aquellas del epitelio respiratorio desde las vías aéreas superiores hasta los alvéolos.

La enfermedad puede presentarse como una infección asintomática o en formas leves como rinitis o faringitis. Como complicaciones más graves y a veces fatales, pueden ocurrir neumonías, particularmente en personas mayores con enfermedades crónicas. La edad es un factor muy importante en las epidemias anuales de gripe. Si bien las tasas de incidencia son mayores en niños pequeños y adolescentes, la mortalidad es mucho más frecuente entre los enfermos de más edad, tengan o no patología subyacente (Glezen y cols. 1982; OMS 2009b).

La nueva cepa H1N1pdm se caracterizó por producir una enfermedad respiratoria febril auto limitada, con signos y síntomas similares a los de la influenza estacional como fiebre, tos y dolor de garganta. Otros síntomas no típicos de una influenza estacional se manifestaron como mayor potencial para las lesiones pulmonares severas, así como síntomas gastrointestinales como vómitos y diarrea. La población más afectada fueron los niños y adultos jóvenes con una gran tasa de hospitalización en pacientes menores a 50 años, siendo mayores para niños de 0 a 4 años, especialmente en menores a 1 año, aproximadamente el 90% de los casos fatales ocurrieron en menores a 65 años (Jhung 2012). La obesidad severa o mórbida, diabetes, enfermedades cardiovasculares, embarazadas y posibles efectos inmunológicos adversos fueron los que contribuyeron a los casos fatales por H1N1pdm (Louie y cols. 2009).

La enfermedad alcanza su pico de mayor prevalencia durante el invierno, y debido a que el hemisferio norte y el hemisferio sur atraviesan esta estación en diferentes momentos existen, dos temporadas de gripe cada año desde octubre hasta abril en el hemisferio norte y desde mayo hasta septiembre en el hemisferio sur. Además del clima y la humedad, el estilo de vida de las poblaciones y otros factores están asociados a la aparición de la gripe (Gutierrez y cols. 2001).

La gripe es una enfermedad que tiene también notables consecuencias para la actividad económica de los países. Ello obedece al ausentismo laboral y escolar, al que se añaden los costos derivados de la asistencia a los enfermos. El número de hospitalizaciones anuales relacionadas al virus de la influenza supera muchas veces al número de muertes por esta

enfermedad. Todo ello puede llegar a alterar de forma notable la capacidad productiva y económica de una sociedad (OMS 2009b).

## **2.8 RESPUESTA INMUNE**

La recuperación de individuos infectados involucra la activación de una cascada de reacciones inmunes, tanto una respuesta humoral como una respuesta celular. Está generalmente aceptado que la respuesta inmune del hospedero está principalmente enfocada a la proteína HA, y a la NA, por lo que ambas actividades son blanco de anticuerpos específicos que reaccionan frente a ellas previniendo la infección. Luego de la exposición al virus debido a la infección o vacunación, el sistema inmune genera anticuerpos neutralizantes contra estas glicoproteínas, en las mucosas (IgA) y en el suero (IgG). Estos neutralizan al virus por bloqueo del dominio de adhesión en la subunidad HA1, duran de por vida y son la primera barrera de resistencia a la infección. Cinco regiones en la hemaglutinina denominadas epitopes son reconocidos por los anticuerpos. Debido a que los VIA evolucionan y continuamente adquieren nuevos cambios aminoacídicos en estos epitopes, se genera una disminución en el efecto protector de éstos anticuerpos, por lo que es de gran importancia que cada año se modifique la cepa vacunal (Taubenberger y Kash. 2010).

Los anticuerpos anti-neuraminidasa se producen a menor título, más lentamente y su efecto protector se basa en la limitación de la difusión del virus en el tracto respiratorio y al resto del organismo, ya que bloquean la liberación de los virus tras el ciclo replicativo. Además se generan anticuerpos frente a la proteína M y la NP. Estos son tipo específicos y de un valor protector limitado, pero resultan de utilidad para el diagnóstico.

La respuesta inmunitaria celular juega un importante papel en la patogenia de la infección gripal tienen como blanco proteínas internas del virus. En humanos hay dos tipos de células T efectoras: T-CD4+ y T-CD8+. Ambas contribuyen a la inmunidad frente a una infección causada por el virus de la Influenza (Whight y cols. 2007).

La respuesta inmunitaria celular está mediada por células T CD4+ fundamentalmente subtipo específicas y sus funciones principales son la colaboración a las células B para la producción de anticuerpos y a los linfocitos T-CD8 para su proliferación. Las células T CD8+ son tipo específicas, dirigidas preferentemente a los antígenos NP y M, estos aparecen en la sangre de individuos infectados o vacunados entre los días seis a catorce y desaparecen al día veintiuno (Ennis y cols. 1981).

Los virus de la influenza son sensibles a las propiedades antivirales del INF y son eficientes inductores de éste durante la infección (Hill y cols. 1972). El INF es detectado durante la fase aguda de la enfermedad en las secreciones del tracto respiratorio alto y en el suero de pacientes infectados con el virus (Green y cols. 1982). Poblaciones de linfocitos también pueden producir IFN- $\gamma$  o IFN- $\beta$  en respuesta a una infección in vitro con VIA (Yamada y cols. 1986). Se cree que el IFN contribuye a la recuperación de la infección.

## **2.9 PREVENION Y CONTROL**

### **2.9.1 ANTIVIRALES**

Existen dos clases de drogas antivirales disponibles para la profilaxis y tratamiento de la infección por virus influenza A, inhibidores de canal iónico e inhibidores de la neuraminidasa, (ver figura 7). Este tipo de drogas pueden reducir las complicaciones asociadas, la severidad y la duración de la enfermedad si se comienzan a utilizar dentro de las primeras 48 horas luego de iniciados los síntomas (Younkin y cols. 1983). Sin embargo, algunos pacientes pueden desarrollar una replicación viral sostenida a pesar del tratamiento antiviral, lo cual sería un factor de riesgo para la aparición de cepas resistentes a los antivirales (Gubareva. 2004).

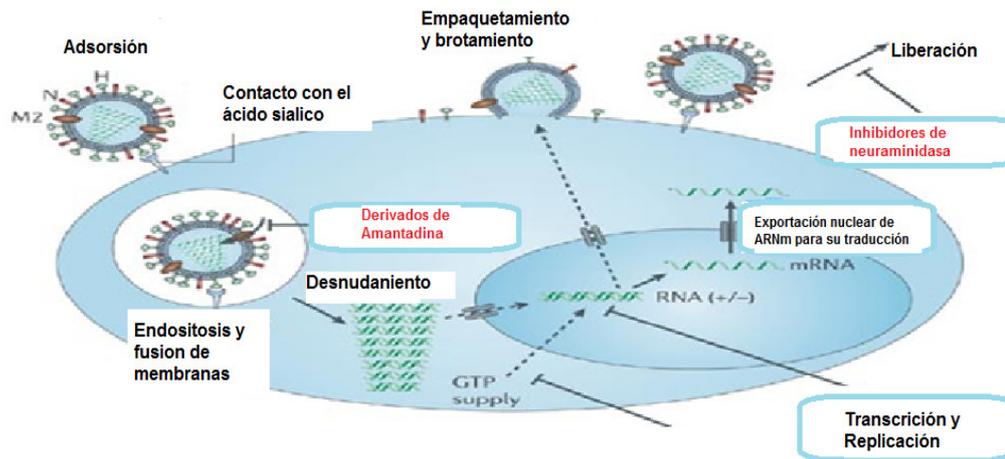
Los adamantanos (amantadina y rimantadina) bloquean el canal iónico que forma la proteína M2 de los VIA, inhibiendo el intercambio de iones necesarios para acidificar el interior del virión y liberar las RNPv al citoplasma (Wang y cols. 1993). Ambos poseen actividad antiviral contra VIA pero no contra VIB ni VIC (Van Voris y Newell. 1992). Si bien los adamantanos están asociados con varios efectos secundarios, han sido ampliamente usados por muchos años quizás debido a su amplia disponibilidad y bajos costos. Los VIA H1N1 pdm del 2009 son resistentes a la amantadina y rimantadina (OMS. 2009c; Ramírez-Gonzales y cols. 2011). Se ha reportado que la mutación responsable de esta resistencia está dada por la sustitución S31N en la proteína M2 la cual es el blanco de esta droga (Dawood y cols. 2009; Shinde y cols. 2009). El segmento génico M de esta cepa pandémica es similar al segmento génico M de los virus porcino Eurasiático, el cual es resistente a ambas drogas. (Chen y Shih. 2009). Las mutaciones que confieren resistencia no comprometen la capacidad replicativa, la patogenicidad, ni la transmisibilidad viral (Bright y cols. 2005).

La presión selectiva dirigida por drogas antivirales no siempre es el responsable del surgimiento de una cepa resistente, un ejemplo de esto es el VIA subtipo H3N2. Durante los últimos años se ha producido un aumento a escala global de esta cepa, la cual surgió en poblaciones donde la amantadina fue poco usada. Tal vez surgió en relación a otras mutaciones benéficas localizadas en otra región del genoma (Simonsen y cols. 2007; Holmes 2009).

Por otro lado, los inhibidores de la neuraminidasa (INA) existen desde 1999 como zanamivir vía inhalatoria y oseltamivir vía oral, estos mimetizan al sustrato de la neuraminidasa y se unen al sitio activo, evitando que este clive los residuos de ácido siálico que pueden unirse a la proteína hemaglutinina (Moscona 2005) y de este modo inhibe la liberación de los nuevos virus formados desde la célula infectada (Liu y cols. 1995; Palese y Shaw. 2007), limitando la infección. Los INA si bien son más costosos, tienen menos efectos secundarios adversos respecto a los inhibidores del canal iónico y se generan menos cepas resistentes, se utilizan de forma profiláctica y terapéutica tanto para VIA y VIB (McKimm-Breschkin. 2005; Wright y cols. 2007).

Se ha reportado un gran aumento de VIA H1N1 resistentes al oseltamivir en Europa, la cual fue causada por la mutación en la posición 275 cambiando un aminoácido histidina por una tirosina en la proteína NA (Gubareva. 2004; Lackemby y cols. 2008). Esta mutación está relacionada a la disminución de la capacidad replicativa viral, disminuyendo la cantidad de NA que alcanzan la superficie celular (Bloom y cols. 2010). La dispersión de VIA H1N1 estacional resistente al oseltamivir fue detectado en el 2007 y actualmente se ha vuelto el predominante entre los VIA H1N1 humanos (OMS. 2008; Sheu y cols. 2009; Dharan y cols. 2009). De este modo, mutaciones secundarias como V234M que disminuye la magnitud del defecto causado por H275Y y R222Q que aumenta la expresión de la NA en la superficie celular estarían implicadas en inhibir la disminución del “fitness” viral causado por H275Y, y de por la tanto permitir la fijación de esta mutación. Sin embargo, a pesar de su predominancia en VIA H1N1, la mutación H275Y han sido raros en los virus H1N1 pdm, así como las mutaciones V234M y R222Q. Sin embargo, 285 casos relacionados a la resistencia al oseltamivir han sido reportados hasta el 14 de abril del 2010 (OMS. 2010b; Ramírez-Gonzales y cols. 2011).

Los antivirales proporcionan una clave farmacológica para responder ante epidemias y pandemias. Sin embargo, la naturaleza altamente mutagénica de estos virus le permite evadir los mecanismos que impiden una eficiente replicación viral. Por lo tanto, nuevos antivirales son necesarios para el tratamiento de la Influenza de modo de resolver las limitaciones de los antivirales actuales. Por esto, avances en el entendimiento de los mecanismos involucrados en la replicación viral han revelado múltiples blancos que están siendo estudiados activamente para la búsqueda de nuevos antivirales. Estos tienen como blanco la NA y las proteínas del complejo de polimerasas y se encuentran en diferentes estadios de desarrollo.



**Figura 7.** Mecanismos de acción de los antivirales. En la figura se observa el lugar donde actúan los INAs en la célula huésped y su mecanismo de acción. La replicación no es bloqueada por los INAs, éstos impiden la salida de los viriones recién formados de la célula huésped y así su diseminación. Por otro lado, se observa el sitio donde actúa la amantadina y los derivados, los cuales si bloquean la replicación del virus, ya que impiden la entrada de las RNPv al citoplasma. (Extraído y adaptado de De Clercq E, 2006)

### 2.9.2 VACUNAS

La forma más eficiente de reducir la morbi-mortalidad causada por los virus Influenza puede ser evitada por la vacunación anual. Las vacunas actuales son altamente efectivas en niños y adultos (70 a 90%). El grupo más vulnerable al virus de la Influenza, los adultos mayores, es el menos afectado por la vacuna, con una eficacia promedio del 30 a 50% a los 65 años, y de 15 a 30 % en mayores de 70 años (Nichol y cols. 2007). Sin embargo la vacunación en personas mayores de 65 años reduce la mortalidad causada por complicaciones asociadas al virus en un 50% (Hak y cols. 2005).

A diferencia de otras enfermedades que pueden ser prevenidas por esta medida, en el caso de la Influenza, no se asocia con una completa protección debido a la continua evolución de la estructura antigénica del virus, endemicidad mundial y la persistencia en reservorios animales. Sin embargo, por más de 50 años han estado disponibles las vacunas contra la enfermedad y la existencia de una red de vigilancia epidemiológica mundial asegura la eficacia de los programas de vacunación. De esta forma se monitorea las características antigénicas y genéticas de las cepas de virus de la Influenza circulantes, para ajustar si es necesario la composición anual de la vacuna (OMS, 2006). Sin embargo, el problema surge cuando una cepa emergente no es predicha con tiempo. El estudio de la evolución y epidemiología del virus es muy importante ya que permite la identificación temprana de estas variantes (Taubenberger y Kash. 2010). La eficacia de cualquier vacuna contra el virus de la Influenza depende de cuán estrechamente se

igualen las cepas de la vacuna con las cepas en circulación. La distancia antigénica entre la cepa vacunal y la cepa circulante puede ser estimada por el número de mutaciones en la secuencia del gen hemaglutinina entre las dos cepas (Smith y cols 2004; Deem y Pan. 2009). Basados en análisis antigénicos de cepas de VIA recientemente aisladas, datos epidemiológicos, estudios serológicos post-vacunación, se formula una vacuna compuesta por una estirpe de VIA H1N1, una estirpe H3N2 y una estirpe de virus de VIB, para cada estación invernal (disponible en <http://www.who.int/csr/disease/influenza/vaccinerecommendations1/en/index.html>). Análisis filogenéticos realizados por Goñi y cols, han demostrado que el virus de la Influenza B que circulo en Uruguay durante el 2002 estaban genética y antigénicamente poco relacionadas con la cepa vacunal para ese año (Goñi y cols. 2007). Estudios realizados para virus de la Influenza A subtipo H3 han demostrado de igual forma que las cepas vacunales se encontraban en clúster diferentes a las cepas circulantes, salvo durante el año 2007 (Goñi y cols. 2009). Análisis de cepas de influenza A H1N1 pandémica circulantes en Sudamérica se agruparon en el clado 5, 6 y 7, mientras que la cepa vacunal, en el clado 1 (Goñi y cols. 2010). Estos estudios nos demuestran la necesidad de monitorear las cepas que circulan en Sudamérica de forma de obtener vacunas mas relacionadas.

### **3. OBJETIVO**

### **3.1 OBJETIVOS GENERALES**

De acuerdo a los antecedentes anteriormente expuestos, este proyecto se plantea como objetivo central el desarrollo de una metodología que nos permita la obtención de genomas de virus Influenza A H1N1 pandémico que han circulado en Uruguay en el año 2009 con el fin de estudiar su grado de variabilidad genética y modo de evolución.

### **3.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS**

- Puesta a punto mediante técnicas de biología molecular para la amplificación de cinco segmentos que codifican para las proteínas HA, NP, NA, M y NS de virus de la Influenza A H1N1 pdm.
- Caracterizar molecularmente los 5 segmentos génicos provenientes de dos muestras de Uruguay de la pandemia de 2009.
- Establecer las relaciones filogenética entre las cepas circulantes en Uruguay en la pandemia del 2009 y las cepas circulantes en otras regiones del mundo.
- Establecer las relaciones filogenéticas entre las cepas circulantes en Uruguay y las cepas previstas en la formulación de la vacuna para el hemisferio sur para el año 2010.
- Comparar la información que brindan los análisis filogenéticos para cada segmento génico en forma particular respecto a la información brindada por el genoma completo.

## **4. MATERIALES Y METODOS**

## **4.1 MUESTRAS**

Se seleccionaron dos muestras (muestra 1 y muestra 2) provenientes de pasajes de virus de la Influenza A subtipo H1N1 pdm obtenidos por aislamiento en cultivos celulares correspondientes al periodo de los meses de Mayo a Agosto del año 2009 pertenecientes a individuos con síntomas clínicos de Influenza, disponibles en el Centro Nacional de Referencia de Influenza, Ministerio de Salud Pública, (Montevideo, Uruguay).

## **4.2 EXTRACCION DE ARN**

El ARN total fue obtenido mediante el uso del kit QIAmp Viral RNA (Qiagen) de acuerdo con instrucciones suministradas por los fabricantes, partiendo de alícuotas de cultivos de células MDCK (células epiteliales de riñón canino Madin-Darby), inoculadas con muestras clínicas. El material así obtenido, fue almacenado a  $-70^{\circ}\text{C}$ , para ser utilizado en la síntesis de ADN complementario (ADNc) y posterior amplificación por reacción en cadena de la Polimerasa anidada (nested PCR).

## **4.3 EVALUACION DE LA CANTIDAD Y CALIDAD DEL ARN**

La cuantificación del ARN se basa, al igual que para ADN, en medidas de absorbancia (Abs) mediante espectrofotometría, utilizando el rango de luz ultravioleta (UV) donde absorben los ácidos nucleicos. Se evaluó la concentración del ARN extraído usando el equipo Nanodrop mediante la lectura de absorbancia a 260 nm. Para el ARN una unidad de absorbancia (UA) equivale a 40  $\mu\text{g/ml}$  ARN, por tanto, el cálculo de la concentración de una muestra de ARN se estima, siendo la concentración del ARN =  $\text{Abs } 260 \times 40 \mu\text{g/ml} \times \text{Factor de dilución}$ .

El ARN es fácilmente degradado por ARNasas, tratamiento con calor y químicos. Para la obtención de resultados fiables, el ARN debe de ser intacto, es decir, no degradado, además de ser libre de proteínas y de contaminación con ADN.

Para determinar la pureza de la muestra se midió utilizando el Nanodrop la relación Abs 260/ Abs 280 la cual debe ser cercano a 2.0 para muestras de ARN puras, y deben tener una relación Abs 260/Abs 230 entre 2.0 a 2.2.

A fin de evaluar el grado de degradación se utilizó el 2100 Bioanalyzer el cual está diseñado para determinar la calidad del ARN y la cantidad de una forma más fiable y rigurosa que los sistemas tradicionales, como el uso de geles de poliacrilamida y agarosa. Consiste en un sistema de micro electroforesis mediante el uso de nano capilares, donde la separación electroforética depende del peso molecular y la fluorescencia detectada. Este sistema minimiza la cantidad de ARN que se usa para este control, además del tiempo empleado. Permite obtener un algoritmo

determinado RIN (numero de integridad del ARN), que determinara la calidad de la muestra de ARN total en un rango del 1 al 10, siendo el 1 el valor para las muestras de ARN totalmente degradadas y 10 el valor para una muestra intacta. Los resultados se visualizan como un electroferograma donde la medida de fluorescencia se correlaciona con la cantidad de un ARN de un tamaño dado.

Para el ARN, el análisis incluye la visualización gráfica de los picos ribosomales, del contenido ribosomal, la concentración de ARN, a partir de la medida del área de los picos y el RIN. La razón 28S/16S es una medida de la degradación del ARN, ya que el ARN 28S es más fácilmente degradado que el 16S. Para muestras de ARN de células eucariotas intactas la relación 28S/16S es igual o mayor a 2.0. El ARN debe tener una buena calidad respecto a la pureza, integridad y contaminación de ADN genómico.

#### **4.4 DISEÑO DE CEBADORES**

Se diseñaron cebadores específicos para la amplificación y secuenciación de 5 de los 8 segmentos que conforman el genoma de VIA subtipo H1N1pdm. Para ello se utilizaron secuencias de VIA H1N1 pdm de diferentes partes del mundo provenientes de la base de datos, se alinearon utilizando el programa Clustal W y se seleccionaron oligonucleótidos en posiciones flanqueantes a la región de interés en cada uno de los segmentos génicos, donde existía conservación de secuencias. Para cada oligonucleótidos el largo de los fue de entre 18 y 25 nt, con una composición de bases G y C de entre 40 y 60% distribuidas uniformemente y una temperatura de melting ( $T_m$ ) de no más de 5°C de diferencia para cada par de oligonucleótidos. Estos posibles oligonucleótidos fueron analizados utilizando el programa Gen Runner Este programa nos permite obtener información entre otras cosas de la posible formación de bucles internos en los oligonucleótidos y su posible dimerización para poder ser utilizados como cebadores. Es importante que la secuencia 3' terminal de un cebador no sea complementario a ningún otro cebador ni consigo mismo, ya que los cebadores se encuentran en altas concentraciones en la reacción de cadena de la polimerasa (PCR), siendo suficiente una débil complementariedad entre ellos para la formación de dímeros, disminuyendo la amplificación de ADN de interés, (ver tabla 2).

Gen	Cebador	Secuencia del cebador		Posición en el gen
		5'	3'	
HA	F25	ctatatacatttgcaaccgc		25
HA	R1675	catattctacactgtagaga		1675
HA	F125	cagtaacacactctgttaac		125
HA	R 1559	ccttggtgattccagcttc		1559
NA	F20	taataaccattggtttcggtc		20
NA	R1384	tcaatggtaaattggcaactc		1384
NA	F517	agatttgagtcagtcgcttg		517
NA	R918	gatattccagattctgggtg		918
M	F M	ccgaggctcgaaacgtacgttc		14
M	RevM	gaccatcgtcaacatccac		938
NS	FNS	atggactccaacaccatgtc		1
NS	RevNS	gcagtagttgtaaggcttgc		772
NP	For-NP-3	ggcgtctcaaggcaccaaacg		3
NP	Rev-NP-1497	tcaactgtcataytctctg		1497
NP	For-NP-485	gaatgtgctctctaatgcaagg		485
NP	Rev-NP-987	gcagagtggcatgccatccac		987

Tabla 2. Nombre, secuencia y posición de los cebadores diseñados para la amplificación y secuenciación de los segmentos génicos HA, NA, M, NS y NP.

## 4.5 TRANSCRIPCIÓN REVERSA Y REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (RT-PCR)

A partir del ARN extraído se realizó la RT-PCR utilizando el kit comercial SuperScript One-Step RT-PCR con Taq Platinum (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Para ello 5 µl del extracto de ARN de concentración conocida en ng/µl fue adicionado a una mezcla conteniendo 25 µl de buffer 2X, el cual incluía, (0.4mM de cada uno de los dNTPs y 2.4mM de MgSO<sub>4</sub>), 1 µl de cada cebador específico de concentración 10µM, 1µl de la enzima, RT / Platinum Taq Mix, (contiene una mezcla de SuperScript II Reverse Transcriptase y Platinum Taq DNA Polimerasa) y se completó con agua ultra pura libre de ARNasas hasta un volumen final de 50 µl.

Las amplificaciones fueron realizadas siguiendo las siguientes condiciones de ciclado en el termociclador Corbett modelo CAS-1200

- Un ciclo de 50°C por 30 minutos, durante el cual se da la reacción de retrotranscripción.

- Un ciclo de 94°C por 2 minutos, donde ocurre la desnaturalización del ADNc, la inactivación de la retrotranscriptasa y la activación de la ADN polimerasa.
- Luego 35 ciclos
  - a) 94°C por 1 minutos, permitiendo la desnaturalización del ADN
  - b) para la unión de los cebadores al molde las condiciones de temperatura varían de acuerdo al segmento de ADNc que se quiere amplificar. Con el fin de poner a punto el protocolo de amplificación se realizaron varias pruebas usando gradientes de temperatura para cada segmento, de acuerdo a las T<sub>m</sub> de cada cebador.
  - c) un paso de 72°C por 2 minutos para la extensión de cadena, (1minuto por cada kb).
- Un ciclo final de extensión de 72°C por 5 minutos en el caso de el gen M, NP y NS y por 10 minutos en el caso de HA y NA.

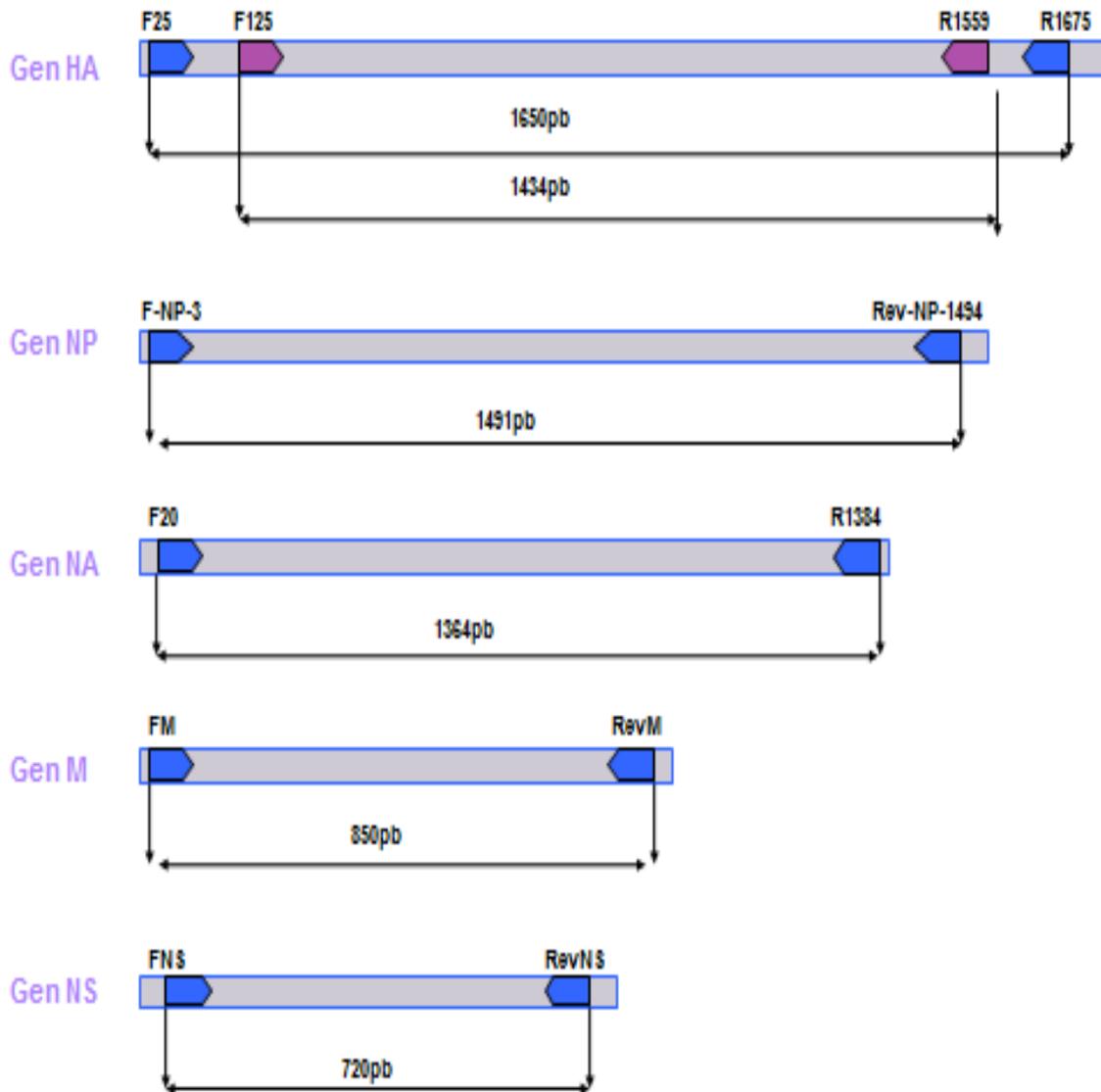
Para la amplificación del HA fue necesario un segundo round de PCR (nested PCR) utilizando un kit comercial (Invitrogen) mediante la utilización de un juego de cebadores internos lo que permite un aumento de la sensibilidad y especificidad. Para ello 1µl del producto de RT-PCR fue agregado a una mezcla que contenía 5 µl de buffer 10X, 1.5 µl de MgCl<sub>2</sub> 50mM, 1 µl de dNTPs de concentración 10mM, 1µl del primer F125 y 1µl del primer R1559, ambos de concentración 10µM, 0.4 µl de enzima Taq platinum y agua ultra pura libre de ARNasas hasta completar un volumen final de 50 µl.

Las condiciones de ciclado para la amplificación de HA durante el segundo round de nested PCR fueron las siguientes:

- Un ciclo de 94°C por 2 minutos, donde ocurre la desnaturalización del ADNc y la activación de la ADN polimerasa.
- Luego 30 ciclos
  - a) 94°C por 1 minutos, permitiendo la desnaturalización del ADN
  - b) con el fin de poner a punto el protocolo de amplificación se realizaron varias pruebas usando gradientes de temperatura de acuerdo a las T<sub>m</sub> de cada cebador y así poder conocer la temperatura y el tiempo para que se de la unión de los cebadores al molde.
  - c) un paso de 72°C por 2 minutos para la extensión de cadena, (1min por cada kb).

En todos los casos se utilizaron controles negativos (agua ultra pura libre de ARNasas en lugar de ácidos nucleicos) así como controles positivos (ARN proveniente de extractos de cultivos de células MDCK infectados con Influenza A H1N1pdm). Los productos de PCR fueron

almacenados a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta realizarse las corridas electroforéticas. La estrategia de amplificación de los 5 segmentos génicos se observa en la figura 8.



**Figura 8.** Diagrama representativo de la puesta a punto para la amplificación de los ocho segmentos del genoma de Influenza A H1N1pdm. En el diagrama se indica el lugar de unión de cada primer en los segmentos de ARN viral y el tamaño del producto de la amplificación.

## **4.6 ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA**

Con el fin de observar los productos amplificados, se realizó una electroforesis en gel de agarosa 1.2% en buffer TAE 1X. Los tamaños de las bandas esperadas son las siguientes: para el segundo round del gen HA es de 1434 pb, para el gen NA 1364 pb, NS 771 pb, para el gen M 924 pb y para el gen NP es de 1491pb.

Para la obtención del gel de agarosa se preparó una solución de agarosa en buffer TAE 1X (40mM Tris- Acetato, 10mM EDTA pH 8) y se calentó junto hasta que se tornara transparente, se mezcló con “good view” (un agente que se une al ADN y se activa bajo luz UV, permitiendo visualizar las bandas), se dejó enfriar unos minutos y se vertió la misma dentro de las cubetas niveladas de forma correcta. Se dejó gelificar por aproximadamente 20 minutos para poder retirar los peines y verter sobre el gel 100 ml de TAE 1X, como buffer de corrida.

A continuación se sembraron en cada pocillo 10 µl del producto de RT-PCR, para cada muestra, control positivo y control negativo, provenientes de una mezcla realizada anteriormente la cual contenía además de dicho producto, 2 µl de buffer de carga 6X compuesto tanto de azul de bromo fenol y Xilencianol. Además en un pocillo se sembró como referente de corrida un marcador de peso molecular de 100pb (BioLabs). La corrida fue realizada durante 50 minutos a 90 voltios (V) para que el frente de corrida alcance las tres cuartas partes del gel. Por último el gel se visualizó en un documentador de geles con luz ultravioleta (Gel Doc X5 170-8170, Biorad).

## **4.7 PURIFICACION DE LOS PRODUCTOS DE PCR**

Los productos de PCR obtenidos fueron purificados a partir del gel de agarosa, utilizando el kit de purificación de QIAquick Gel Extraction (Qiagen), de acuerdo con las instrucciones suministradas por el fabricante. Durante la purificación se eliminan los dímeros de cebadores y productos inespecíficos que se generen en la reacción de PCR y que puedan interferir con la secuencia de interés.

Para la cuantificación del producto de ADN purificado se utilizó la espectrofotometría señalada anteriormente. En el caso de ADN,  $1 \text{ UA } 260 \text{ nm} = 50 \text{ µg/mL}$ . Se midió la absorbancia de la muestra a 280 nm para determinar la pureza de la muestra, considerando relaciones  $\text{Abs } 260/\text{Abs } 280 > 1,8$  como muestras de buena calidad.

## 4.8 CLONACION DE LOS PRODUCTOS DE PCR

Con la finalidad de poder estudiar a futuro la población de cuasiespecies de cada uno de los segmentos estudiados en esta tesis, los productos de PCR fueron adenilados y clonados en un vector pGEM-T-Easy.

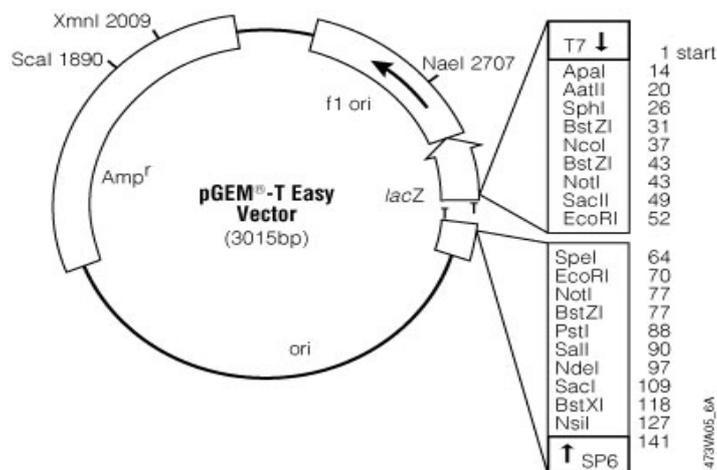
### 4.8.1 ADENILACION DE LOS PRODUCTOS DE PCR

Los productos purificados son adenilados, osea se les incorpora a través de la reacción de adenilación adeninas en el extremo 5' de forma que se puedan unir por complementariedad de bases al vector de clonación que posee timidina terminales. A pesar de que las polimerasas utilizadas, tanto en la reacción de RT-PCR como en la nested PCR, agregan adeninas al final de la cadena de ADN, con el fin de aumentar la eficiencia de la ligación y debido a que algunos purificados tenían un tiempo guardados a -20°C, se llevo a cabo este procedimiento. Para ello se realizo una mezcla de 3 µl conteniendo 1 µl de buffer Taq invitrogen 10X, 0.5 µl de dATPs 10mM, 0.5 µl de MgCl<sub>2</sub> 50mM y 1 µl de la enzima Taq invitrogen 5U/µl. A dicha mezcla se le adiciono 7 µl del producto purificado. Se lo incubo a 72°C por 30 minutos en el termociclador.

### 4.8.2 LIGACION EN VECTOR pGEN-T-Easy

El pGEM-T-Easy, (ver figura 9), es un vector utilizado para la clonación de fragmentos, se encuentra linealizado y presenta en ambos extremos 3' una timidina terminal. Esta timidina saliente en el sitio de inserción aumenta la eficiencia de la ligación, previniendo también la recircularización del vector y generando un extremo compatible con el producto de PCR debido a las adeninas añadidas por la polimerasa termo sensible o a través de la reacción de adenilación anteriormente mencionada.

El producto de interés fue ligado utilizando 1 µl del vector pGEM-T-Easy (Promaga) 50 ng/ µl, 3 µl de inserto de concentración conocida (ver tabla 5), 5 µl de buffer de ligación 2 X y 1 µl de T4 ADN ligasa 3U/µl. La mezcla se incubo a 4°C por más de 12 horas. Se realizó además un control negativo con agua en lugar de ADN.



**Figura 9.** Mapa de restricción del vector pGEM-T-Easy

#### 4.8.3 TRANSFORMACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE LIGACIÓN

Para la transformación se utilizaron células competentes, cepas de *E. coli* XL1-blue. Estas cepas presentan deleciones del operon *lac* y un episoma con el gen *lac Z*, cuyo producto es la  $\beta$  galactosidasa. Se produce  $\beta$  galactosidasa cuando la información faltante en el episoma es provista por el plásmido.

Las células XL1-blue (almacenadas a  $-80^{\circ}$ ) fueron colocadas en hielo por 10 minutos. Luego se les agregó 3  $\mu$ l del producto de ligación y 0.5  $\mu$ l de  $\beta$  mercaptoetanol y se las incubó en hielo por 30 minutos. A continuación fueron colocadas en baño seco a  $42^{\circ}\text{C}$  por 45 segundos para generar el shock térmico. Para finalizar se les agregó 800  $\mu$ l de LB a temperatura ambiente a cada reacción de transformación y se incubaron con agitación a  $37^{\circ}$  por una hora (225 a 250 rpm).

A las placas previamente preparadas se les adicionó, en condiciones de esterilidad, 40  $\mu$ l de X-Gal (5-Bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactopiranosido) 20ng/ml, 7  $\mu$ l de IPTG (isopropil- $\beta$ -D-tiogalactósido) 0.8M. En las mismas se plaqueó 100  $\mu$ l del producto de ligación. A los 700  $\mu$ l restantes se les realizó un spin a máxima velocidad y al sedimento obtenido se le agregó 150  $\mu$ l de LB siendo esto luego plaqueado en una placa diferente denominada resto. Se dejan las placas en la estufa a  $37^{\circ}\text{C}$  entre 16 y 24 horas.

#### 4.8.4 SELECCIÓN DE TRANSFORMANTES Y OBTENCIÓN DEL ADN PLASMÍDICO

Fueron seleccionadas las colonias blancas ya que son las que incorporaron el vector con el inserto, debido a que el inserto se localiza dentro del gen de la  $\beta$ -galactosidasa, no se permite su expresión y por lo tanto la metabolización del X-Gal a un producto de color azul. Se picaron las colonias blancas y fueron introducidas en tubos con 4  $\mu$ l de LB y 1  $\mu$ l de ampicilina por 1ml de LB medio líquido. Además se hizo un control negativo con medio y un puntero sin picar. Los tubos se incubaron a 37°C con agitación entre 14 y 18 horas.

Para la obtención del ADN plasmídico se realizó miniprep por lisis alcalina. Para cada tubo se centrifugó el cultivo a 12.000rpm por 3 minutos, removiendo luego el sobrenadante por aspiración. Se resuspendió el sedimento en 100  $\mu$ l de solución 1 fría: (Tris HCl 50mM pH 8, EDTA 10mM) con vortex. Se agregó 200  $\mu$ l de solución 2 (NaOH 200mM, SDS 1%), se mezcló por inversión y se incubó por 5 minutos en hielo. Luego se agregó 150  $\mu$ l de solución 3 fría (Acetato de potasio 3 M pH 4.8) invirtiendo el tubo, se incubó 5 minutos en hielo. Se realizó una centrifugación a máxima velocidad por 5-8 minutos, se tomó el sobrenadante donde se encontraba el ácido nucleico, luego se agregaron dos volúmenes de etanol 100%. Se mezcló por inversión y centrifugó 5 minutos a máxima velocidad a 4°C, precipitando el ADN del plásmido. Al finalizar se lavó el sedimento con 500  $\mu$ l de etanol 70%, y se centrifugó a máxima velocidad por 2 minutos a 4°C, se dejó secar el sedimento y se le agregó 35  $\mu$ l de agua para resuspenderlo más 1  $\mu$ l de RNasas 10 mg/ml. Para terminar se incubó por 10 minutos a 65°C.

#### 4.8.5 DIGESTION CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN

Para verificar la presencia del inserto clonado en el vector pGEN-T-Easy se utilizó la enzima EcoRI. Se evaluó a través del programa NTI-vector, si los segmentos genómicos tenían cortes internos para esta enzima. Se colocaron 4  $\mu$ l de ADN plasmídico, 2  $\mu$ l de buffer 10X, 0.5  $\mu$ l de EcoRI (10U/ $\mu$ l) en un volumen final de 20  $\mu$ l. Se incubó 2 horas a 37°C. Los productos de digestión se visualizaron en geles de agarosa.

### 4.9 SECUENCIACION

Los productos de PCR fueron enviados para su secuenciación al Servicio de secuenciación del Instituto Pasteur de Montevideo, utilizando un secuenciador automático de 4 capilares, ABI3130 (Applied Biosystems). El secuenciador utiliza el *método enzimático de Sanger* o *método de dideoxinucléotidos* (Sanger y cols.1977). Para este método resulta esencial disponer de un ADN de cadena simple o molde y un cebador complementario de una región del ADN molde anterior a donde va a iniciarse la secuencia. Este cebador se utiliza como sustrato de la enzima ADN

polimerasa I que va a extender la cadena copiando de forma complementaria el molde de ADN. Para ello se utilizaron todos los cebadores diseñados de cada segmento génico, con excepción de F25 y R1675 en el caso del gen HA (ver tabla 2).

#### **4.10 ANALISIS DE SECUENCIAS**

Los electroferogramas obtenidos fueron analizados y corregidas manualmente utilizando el programa bioinformático CHROMAS, versión 2.32 (Technelysium). Con el fin de obtener relaciones filogenéticas entre las secuencias obtenidas y las secuencias correspondientes de cepas de Influenza pandémica H1N1 que circularon en el año 2009 en distintas partes del mundo obtenidas de la Base de Datos de Influenza de los Alamos (FLU LANL database) disponible en <http://www.fludb.org/brc/home.do?decorator=influenza>, estas secuencias fueron alineadas utilizando el programa Clustal W (Thompson y cols, 1994). Clustal W es un programa que permite hacer alineamientos globales de nucleótidos y crea alineamientos múltiples de un grupo de secuencias empleando alineamiento progresivo de pares de bases. Una vez alineadas las secuencias se realizaron los análisis filogenéticos.

Con este propósito se utilizó el programa Model Generator (Keane y cols. 2006) a fin de determinar el modelo evolutivo que mejor describía nuestro juego de datos, el cual utiliza el criterio informativo de Akaike (AIC) y el Hierarchical Likelihood Ratio Test. AIC toma en consideración tanto la medida en que el modelo se ajusta a las series observadas como el número de parámetros utilizados en el ajuste, de esta forma busca el modelo que describa adecuadamente las series y tenga el mínimo AIC.

Utilizando el modelo obtenido mediante el programa Model Generator, se construyeron árboles filogenéticos de máxima verosimilitud (Maximum Likelihood) con el programa PhyML (Guidon y cols. 2005), disponible en <http://www.phylogeny.fr/phylo.cgi/phyml>. Como medida de la robustez de cada rama de los árboles filogenéticos utilizamos un ensayo de probabilidad aproximado (aLRT), que demuestra que la rama estudiada provee una verosimilitud significativa contra la hipótesis nula que involucra colapsar esa rama del árbol pero dejar el resto de la topología del árbol idéntica (Anisimova y Gascuel 2006).

## **5. RESULTADOS**

## 5.1 EVALUACION DEL ARN EXTRAIDO

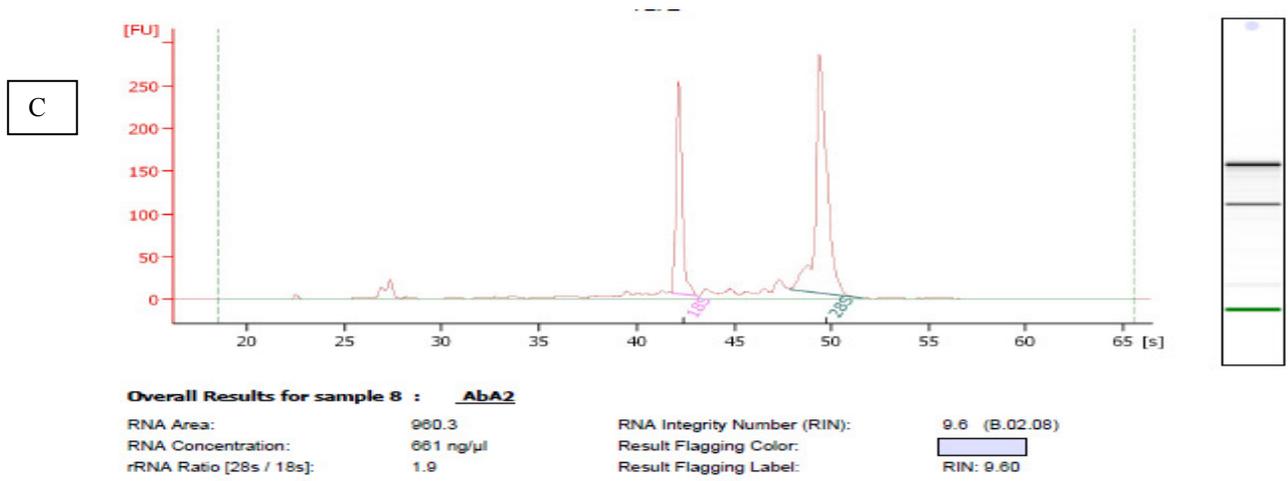
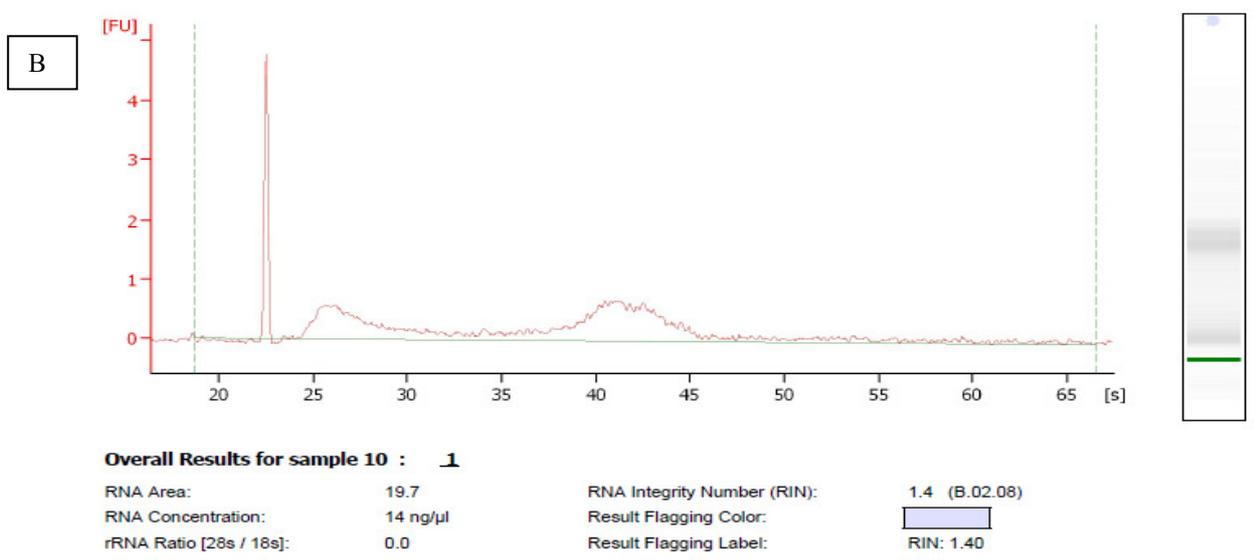
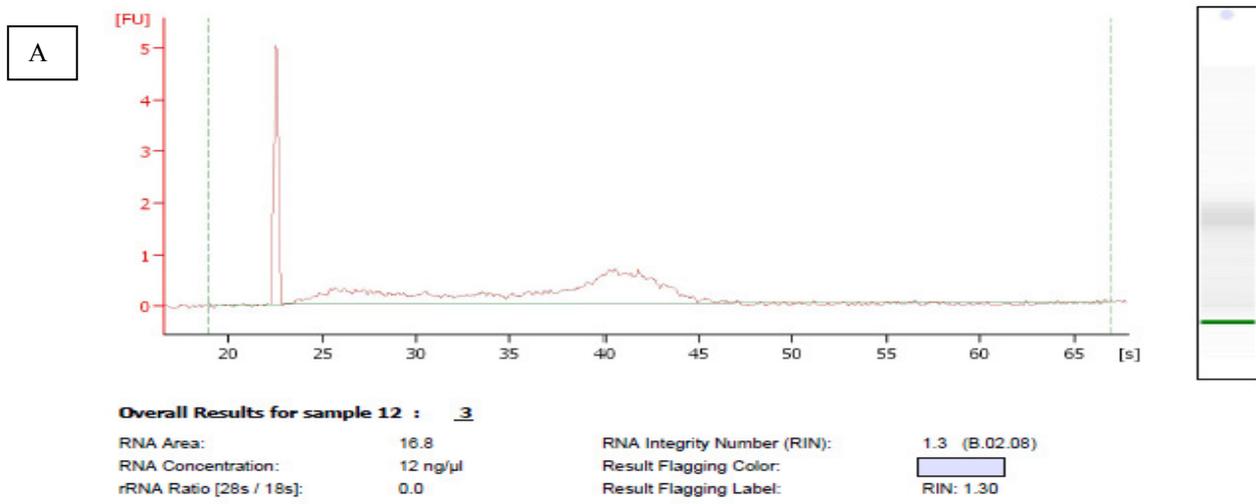
Con el fin de estudiar la variabilidad genética de virus de Influenza A H1N1 pandémicos circulantes en Uruguay en el año 2009, se procedió a la extracción de ARN de muestras de pacientes que habían sido previamente aisladas en cultivo de células MDCK en el laboratorio de Referencia de Influenza del Ministerio de Salud Pública.

De forma de evaluar la calidad del ARN extraído, mediante el uso del kit QIAmp Viral RNA de QIAGEN, se utilizó el Nanodrop para medir tanto la concentración como la pureza del ARN mediante la relación de absorbancia a 260 y 280nm. La concentración de ARN obtenida fue de 46.11 ng/  $\mu$ l para la muestra 1 y 26.46 ng/ $\mu$ l para la muestra 2 (ver tabla 3).

Por otro lado, se evaluó la concentración e integridad del ARN total mediante la utilización del Bioanalyzer. La evaluación de la integridad del ARN es un paso crítico para el éxito a la hora de las amplificaciones por RT-PCR. Se puede observar en la figura 9, una grafica mostrando el grado de integridad del ARN total y la concentración tanto para la muestra 1, para la muestra 2 y para una extracción de ARN celular a modo de ejemplo. El numero de integridad del ARN total (RIN) para la muestra 1 fue de 1.4 y para la muestra 2 de 1.3, siendo 0 el valor de la razón (28s / 18s). Las medidas de concentración obtenidas utilizando el Bioanalyzer fueron de 14 ng/ $\mu$ l para la muestra 1 y de 12 ng/ $\mu$ l para la muestra 2 (ver figura 10)

Muestra de ARN	Concentración ng/ $\mu$ l Nanodrop	Concentración ng/ $\mu$ l BioANALYSER
Muestra 1 (094/3)	46.11	14 ng/ $\mu$ l
Muestra 2 (093/3)	26.46	12 ng/ $\mu$ l

**Tabla 3.** Medidas de concentración de los ARN a través del Nanodrop y del Bioanalyzer.



**Figura 10.** Análisis de los ARN mediante el Bioanalyzer. En la parte A: se observa la grafica fluorescencia en función del tiempo para la muestra 2, observándose valores de concentración y de RIN. En la parte B: se observan los valores de concentración y RIN para la muestra 1. En la parte C: se muestra el mismo procedimiento pero para un análisis de ARN celulares a modo de ejemplo.

## 5.2 PUESTA A PUNTO DE LA RT-PCR PARA LOS DIFERENTES SEGMENTOS DEL GENOMA DEL VIRUS INFLUENZA A H1N1 pdm.

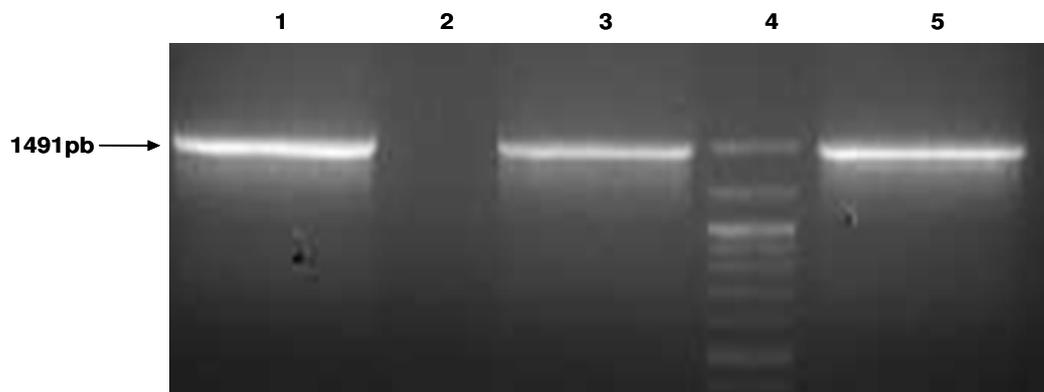
Luego de la extracción del ARN, se realizó la optimización para la amplificación por RT-PCR, para los genes HA, NA, NP, M y NS de VIA. Para cada uno se determina la temperatura de annealing óptima: 51°C para los segmentos HA y NA, 55°C para los segmentos M y NS y 57°C para el segmento NP, siendo éstas las temperaturas donde se obtuvo una única banda y de buena intensidad, (ver tabla 4).

Gen	Temperatura	Tiempo
HA	51°C	1 min
NP	57°C	1min
NA	51°C	1min
M	55°C	1min
NS	55°C	1min

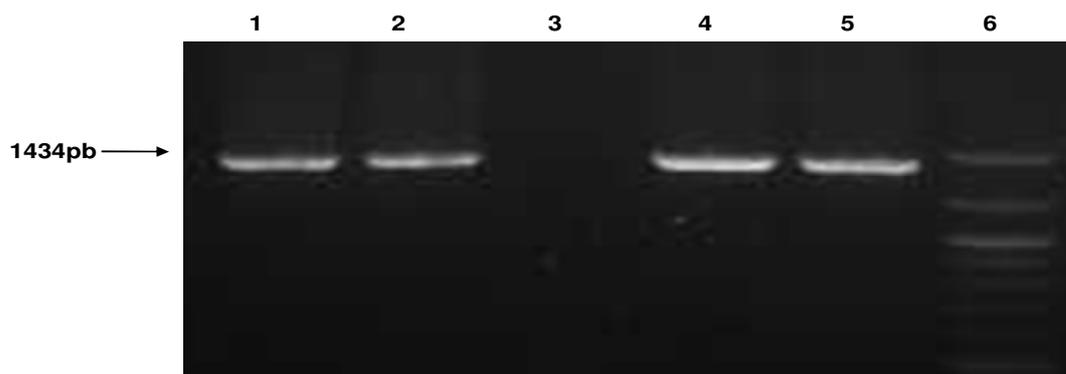
**Tabla 4.** Temperaturas de annealing para la amplificación del gen HA, NP, NA, M y NS.

Los fragmentos de ADN amplificados fueron visualizados mediante electroforesis en geles de agarosa 1.2%. En cada uno de los geles de agarosa se cargaron 10 µl de cada una de las muestras, control positivo y control negativo y también se cargo el marcador de peso molecular de 100pb (BioLabs).

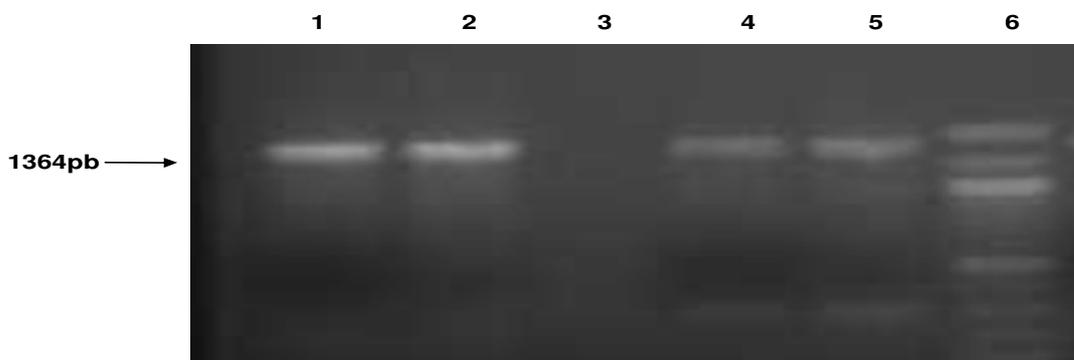
En el caso del gen NP el producto de amplificación fue de una banda de 1491pb (ver figura 11). Para el gen HA durante el primer round no se obtuvo banda en el gel de agarosa, mientras que en el segundo round se observó una banda de 1434pb (ver figura 12). Para el gen NA se obtuvo una banda de 1384pb (ver figura 13). En el gel de agarosa para el segmento génico M se observó una banda de 924pb, (ver figura 14). Por último se obtuvo una banda de 771pb para el gen NS, (ver figura 15).



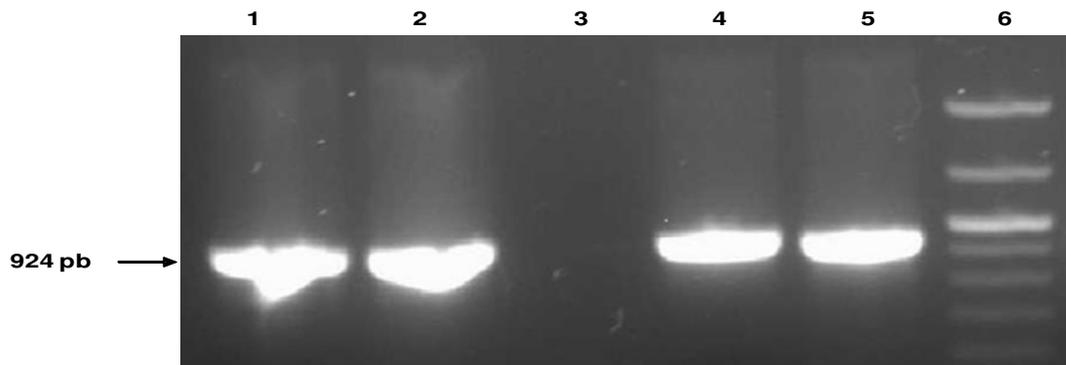
**Figura 11.** Electroforesis en gel de agarosa de los productos del PCR del gen NP. Carril 1: muestra 1., Carril 2: control negativo., Carril 3: muestra 2., Carril 4: marcador de peso molecular de 100pb (BioLabs), Carril 5: control positivo.



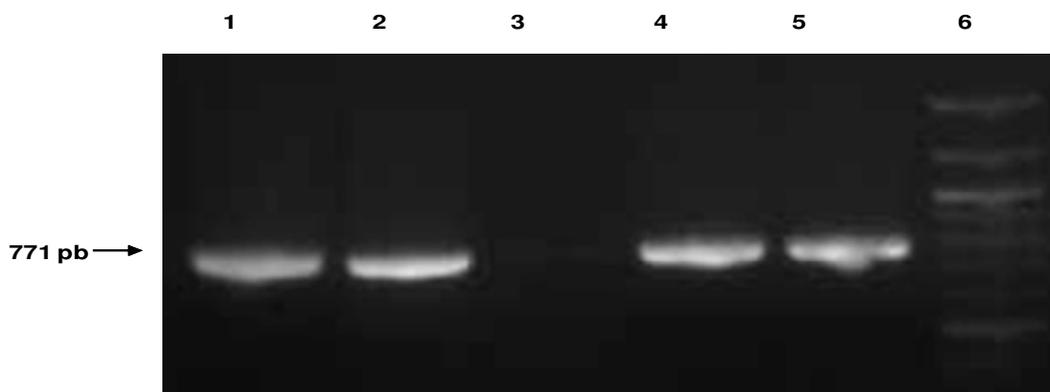
**Figura 12.** Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR del gen HA. Carril 1: muestra 1., Carril 2: muestra 2., Carril 3: control negativo., Carril 4 y 5: control positivo., Carril 6: marcador de peso molecular de 100pb (BioLabs).



**Figura 13.** Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR del gen NA. Carril 1: muestra 1., Carril 2: muestra 2., Carril 3: control negativo., Carril 4 y 5: control positivo., Carril 6: marcador de peso molecular de 100pb (BioLabs).

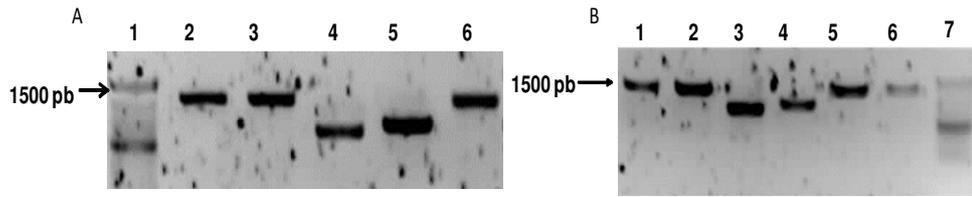


**Figura 14.** Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR del gen M. Carril 1: muestra 1., Carril 2: muestra 2., Carril 3: control negativo., Carril 4 y 5: control positivo., Carril 6: marcador de peso molecular de 100pb (BioLabs).

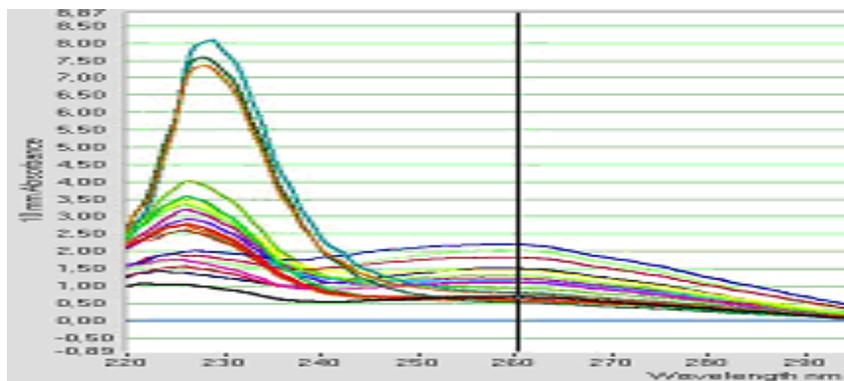


**Figura 15.** Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR del gen NS. Carril 1: muestra 1., Carril 2: muestra 2., Carril 3: control negativo., Carril 4 y 5: control positivo., Carril 6: marcador de peso molecular de 100pb (BioLabs).

Los amplicones obtenidos fueron purificados de acuerdo a lo establecido en materiales y métodos. Se realizó un gel de agarosa 1.2% para los purificados, en el cual se sembró en cada pocillo 6ul (4  $\mu$ l de cada uno de los purificados mas 2 $\mu$ l de buffer de carga 6X). También se sembró el peso molecular, (ver figura 16). Se determinó la concentración de ADN para cada uno de los purificados a partir de la medida de absorbancia 260 y 280nm utilizando el Nanodrop (ver figura 17 y tabla 5).



**Figura 16.** a) Electroforesis en gel de agarosa de los purificados de cada segmento génico de la muestra 1.. Carril 1: marcador de peso molecular de 100pb., Carril 2: NP., Carril 3: HA., Carril 4: NS., Carril 5: M y en el Carril 6: NA. b) Electroforesis en gel de agarosa de los purificados de cada segmento génico de la muestra 3. Carril 1: HA., Carril 2: NP., Carril 3: NS., Carril 4: M., Carril 5: NA., Carril 6: NA y Carril 7: marcador de peso molecular de 100pb.



**Figura 17.** Grafico de Absorbancia vs. Longitud de onda. Se muestran las medidas de absorbancia de los ADN purificados para los diferentes segmentos génicos utilizando el Nanodrop.

Muestras	Gen	Concentración ng/ $\mu$ l
1	NP	71.91
2	NP	56.62
1	HA	34.2
2	HA	29.86
1	NA	55.5
2	NA	70.8
1	M	38.04
2	M	40.52
1	NS	109.6
2	NS	90.68

**Tabla 5.** Medidas de concentración en ng /  $\mu$ l para los ADN purificados para los diferentes segmentos génicos, obtenidos a través del Nanodrop.

Cada uno de los amplicones fue secuenciado bidireccionalmente por el método de dideoxinucleotidos utilizando los cebadores empleados para la reacción de RT-PCR y cebadores internos (ver tabla 2).

Por otro lado, con el fin de en un futuro estudiar las cuasiespecies virales, los segmentos génicos fueron clonados utilizando el vector pGem T Easy. Durante la selección de transformantes se observo en cada una de las placas pocas colonias blancas y azules. Las pocas colonias blancas que se observaron puede deberse a la baja eficiencia de ligación y transformación. El hecho de que el número de colonias azules fue bajo también habla de que la baja eficiencia pudo haber sido en el momento de transformación o a una mala calidad de las células competentes, cepas de E.coli XL1-blue utilizadas en este proceso. Se picaron 30 colonias por placa, se crecieron y se extrajo el ADN plasmidico, para posteriormente verificar la presencia del inserto, realizar la secuenciación, y estudiar las cuasiespecies virales.

### **5.3 ANALISIS FILOGENETICOS**

De forma de conocer las relaciones filogenéticas de los virus de Influenza A H1N1pdm circulantes en Uruguay, las secuencias obtenidas de los segmentos génicos HA, NA, NP, M y NS provenientes de dos muestras aisladas en Uruguay fueron alineadas con secuencias correspondientes a cepas de influenza pandémica H1N1 que circularon en el año 2009 en distintas partes del mundo. Dichas secuencias fueron obtenidas de la Base de Datos de Influenza de los Alamos (FLU LANL database), (disponible en: <http://www.fludb.org/brc/home.do?decorator=influenza>) hasta noviembre de año 2009, las cuales son representativas de todos los clados descriptos recientemente para las cepas H1N1 pdm (Nelson y cols. 2009). Estas secuencias fueron alineadas utilizando el programa Clustal W (Thompson y cols. 2004). Una vez realizado el alineamiento para cada segmento génico, se determino el modelo que mejor describía nuestros conjuntos de datos de secuencia y se obtuvo que en todos los casos el AIC y el Hierarchical Likelihood Ratio Test indicaron que el modelo de sustitución HKY era el mejor.

Por otro lado se realizo un alineamiento utilizando los marcos abiertos de lectura (ORF) concatenados de los genes HA, NP, NA, NS1 y M de las dos muestras de Uruguay y de diferentes partes del mundo. Se crearon los árboles filogenéticos de máxima verosimilitud bajo el modelo HKY, utilizando el programa PhyML (Guidon y cols. 2005) (disponible en: <http://www.phylogeny.fr/phylo.cgi/phyml>). La robustez de cada nodo fue evaluada por un ensayo de probabilidad aproximado (aLRT).

En una primera instancia, se realizaron los análisis filogenéticos de todos los segmentos utilizando los ORF concatenados de los genes HA, NP, NA, NS y M de las dos muestras de Uruguay y diferentes partes del mundo. Los mismos se compararon con análisis filogenéticos reportados recientemente por Potdar y colaboradores (2010), (Figura 6). En este estudio se muestra una temprana diversificación de la pandemia en 7 clados utilizando el genoma completo concatenado, al igual que lo reportado por Nelson y colaboradores (2009). Nuestros resultados utilizando la concatenación de los 5 segmentos del genoma de VIA muestran claramente la presencia de los 7 clados ya descritos, a pesar de no contar con el genoma completo. Se puede observar además que ambas muestras de Uruguay se disponen en el clado 7, Mientras que la secuencia de la cepa vacunal para el hemisferio sur: (A/California/07/2009) pertenece al clado 1 (ver figura 18).

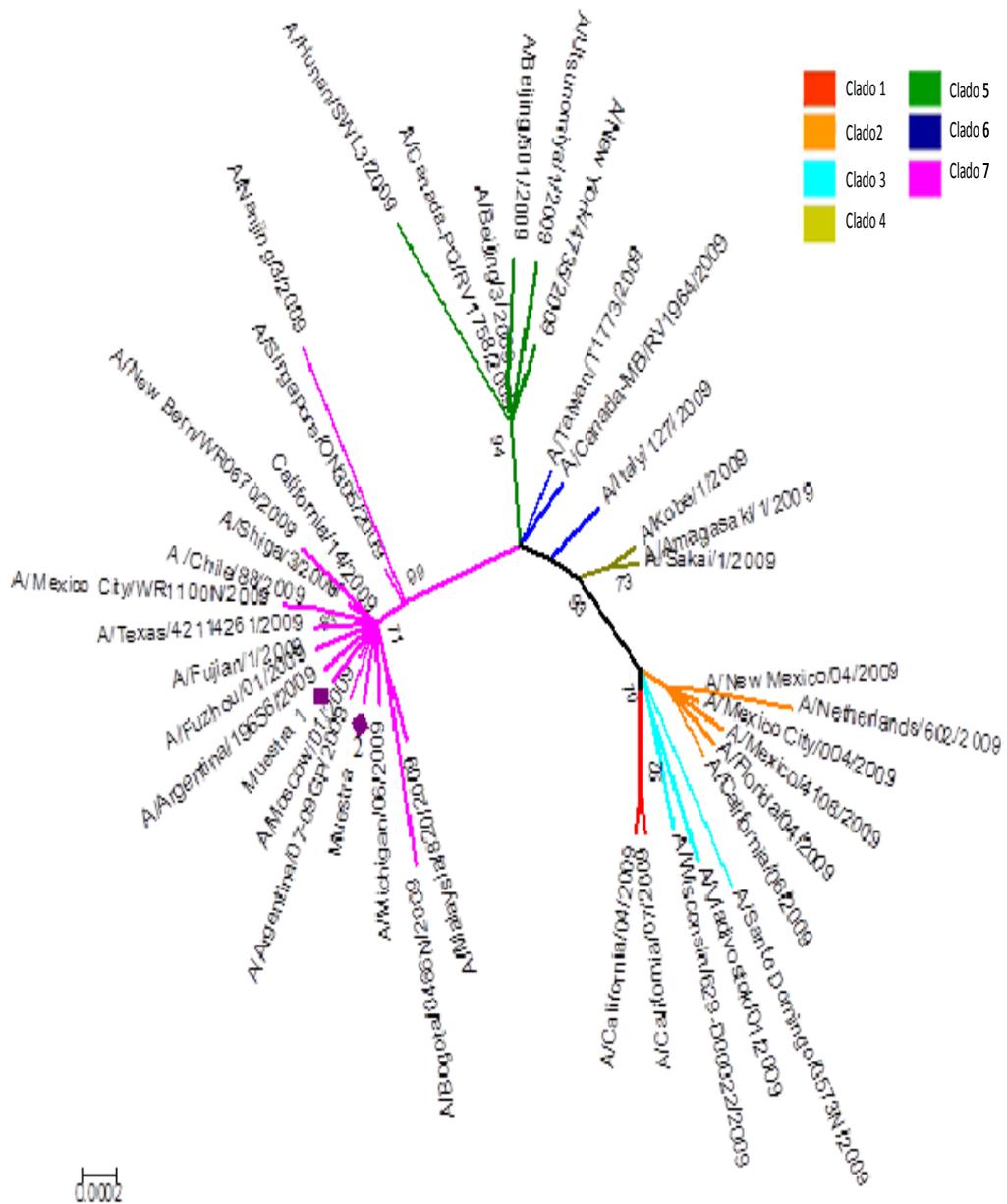
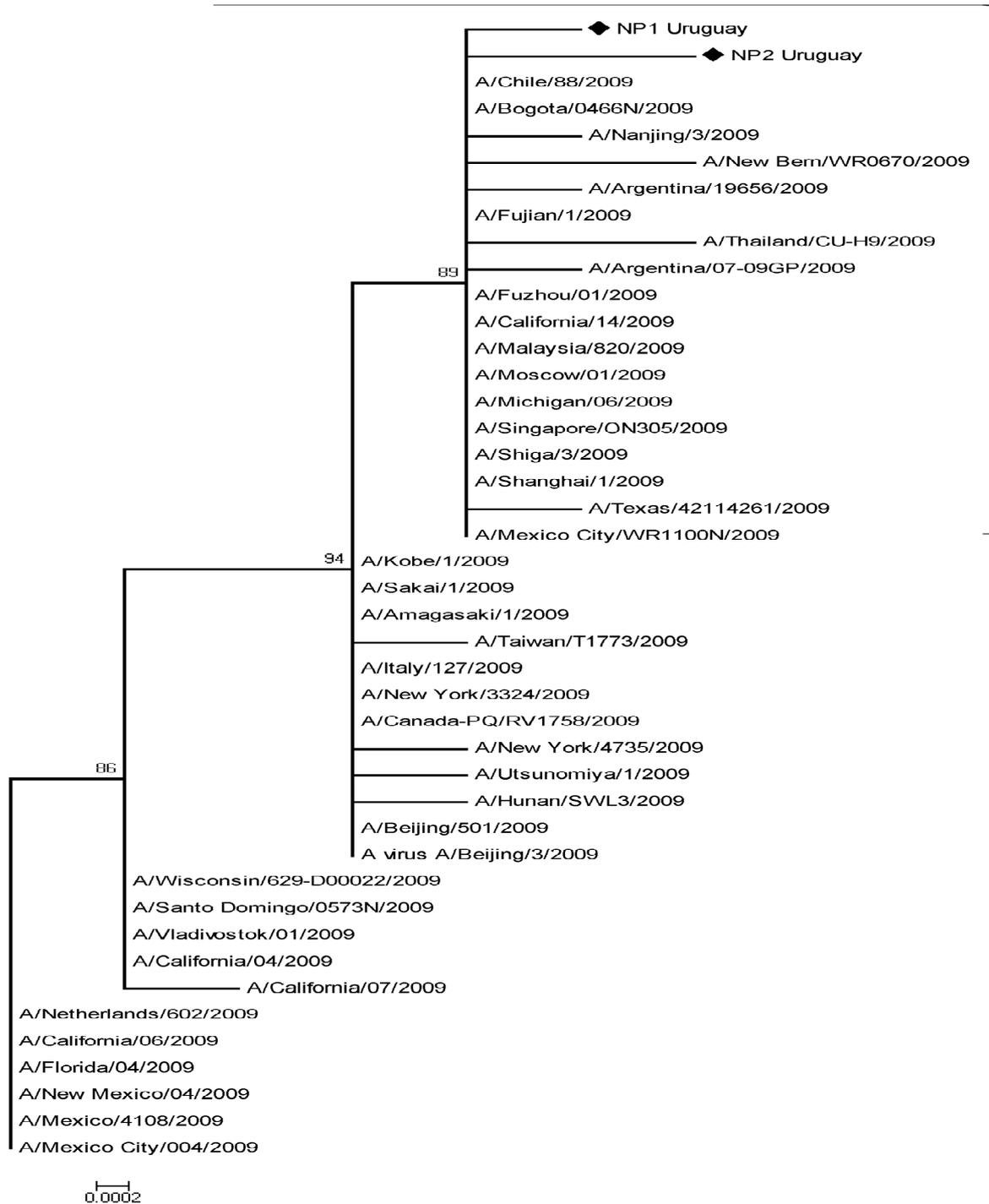


Figura 18. Árbol filogenético de máxima verosimilitud utilizando la información génica de los segmentos HA, NP, NA, NS y M concatenados correspondientes a la muestra 1 y 2. El árbol filogenético fue obtenido mediante la utilización del modelo evolutivo HKY y el método de máxima verosimilitud. Las diferentes cepas se indican la procedencia y el año de aislamiento dentro de estas se evalúa la muestra A/California/07/2009, la cual fue designada como cepa vacunal para el hemisferio sur en el año 2010. Los números en cada nodo indican los valores de aLTR. La barra en la parte inferior de la figura denota distancia.

Seguidamente se realizaron los estudios filogenéticos donde se analizaron los segmentos génicos por separado. Como podemos observar en la figuras 19 a la 23, para los árboles filogenéticos obtenidos utilizando las secuencias de los segmentos génicos por separado HA, NP, NA, M, y NS respectivamente, muestran claramente la presencia del clado 7, ya descrito anteriormente por Nelson y colaboradores (2009) utilizando el genoma completo concatenado. Sin embargo en estos árboles la presencia de los 7 clados no se encuentra totalmente definida, aunque se puede evidenciar la presencia de alguno de ellos.

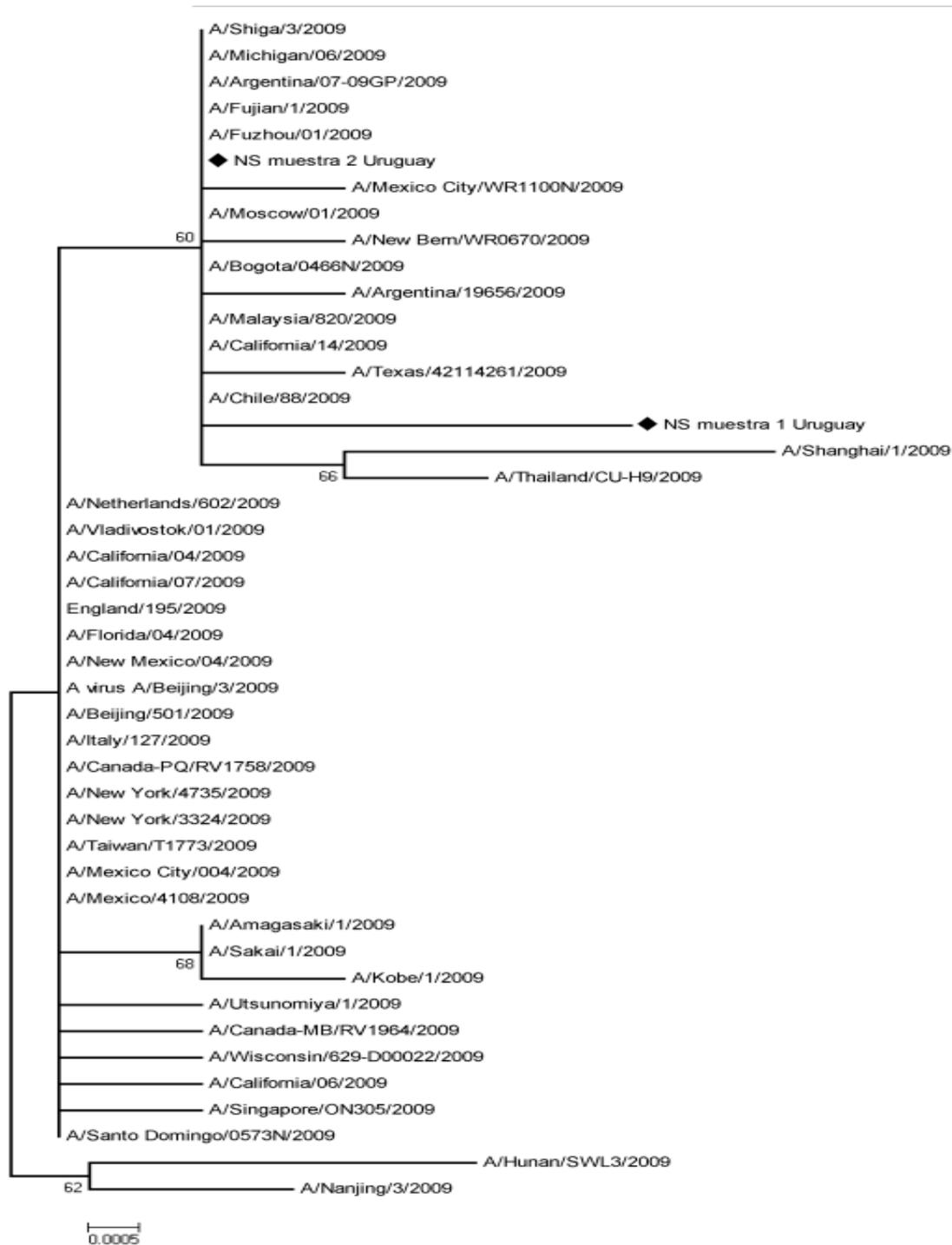




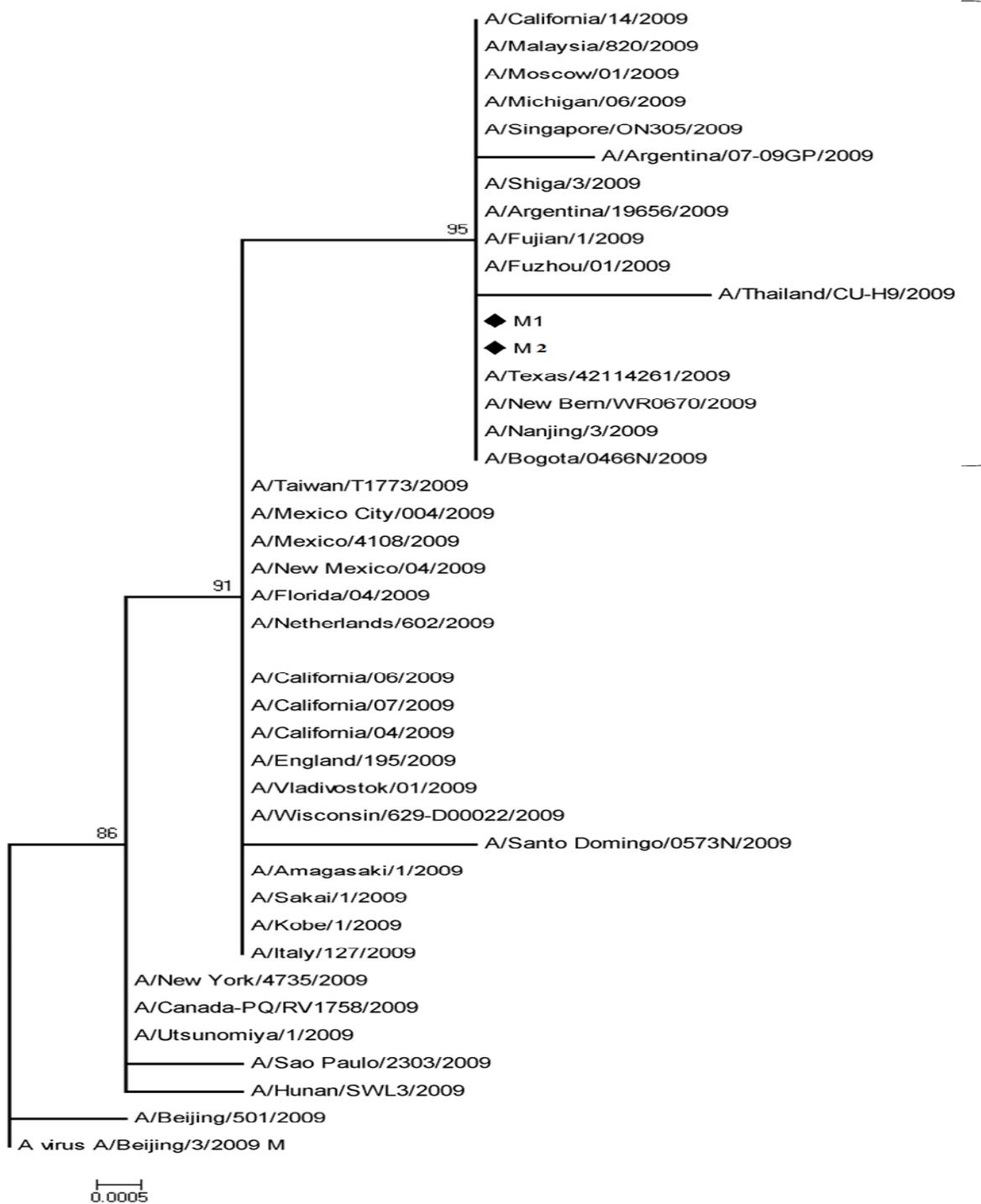
**Figura 20.** Árbol filogenético de máxima verosimilitud utilizando la información génica de los segmentos NP correspondientes a la muestra 1 (representada como NP1) y de la muestra 2 (representada como NP2). El árbol filogenético fue obtenido mediante la utilización del modelo evolutivo HKY y el método de máxima verosimilitud. Las diferentes cepas indican la procedencia y el año de aislamiento dentro de estas se evalúa la muestra A/California/07/2009, la cual fue designada como cepa vacunal para el hemisferio sur en el año 2010. Los números en cada nodo indican los valores de aLTR. La barra en la parte inferior de la figura denota distancia



**Figura 21.** Árbol filogenético de máxima verosimilitud utilizando la información génica de los segmentos NA correspondientes a la muestra 1 (representada como NA1) y 2 (representada como NA2). El árbol filogenético fue obtenido mediante la utilización del modelo evolutivo HKY y el método de máxima verosimilitud. Las diferentes cepas se indican la procedencia y el año de aislamiento dentro de estas se evalúa la muestra A/California/07/2009, la cual fue designada como cepa vacunal para el hemisferio sur en el año 2010. Los números en cada nodo indican los valores de aLTR. La barra en la parte inferior de la figura denota distancia.



**Figura 22.** Árbol filogenético de máxima verosimilitud utilizando la información génica de los segmentos NS correspondientes a la muestra 1 (representada como NS muestra 1) y 2 (representada como NS muestra 2). El árbol filogenético fue obtenido mediante la utilización del modelo evolutivo HKY y el método de máxima verosimilitud. Las diferentes cepas se indican la procedencia y el año de aislamiento dentro de estas se evalúa la muestra A/California/07/2009, la cual fue designada como cepa vacunal para el hemisferio sur en el año 2010. Los números en cada nodo indican los valores de aLTR. La barra en la parte inferior de la figura denota distancia.



**Figura 23.** Árbol filogenético de máxima verosimilitud utilizando la información génica de los segmentos M correspondientes a la muestra 1 (representada como M1) y la muestra 2 (representada como M2). El árbol filogenético fue obtenido mediante la utilización del modelo evolutivo HKY y el método de máxima verosimilitud. Las diferentes cepas se indican la procedencia y el año de aislamiento dentro de estas se evalúa la muestra A/California/07/2009, la cual fue designada como cepa vacunal para el hemisferio sur en el año 2010. Los números en cada nodo indican los valores de aLTR. La barra en la parte inferior de la figura denota distancia

Con el fin de determinar las sustituciones de aminoácidos en la secuencia proteica de HA de cepas del virus Influenza A H1N1pdm aisladas en Uruguay, las secuencias de HA fueron alineadas con la secuencia de la cepa vacunal H1N1 A/California/7/2009, la cual fue recomendada para el hemisferio sur para el año 2010. Una vez alineadas la secuencia de nucleótidos fue traducida a aminoácidos y se observaron las sustituciones que se detallan en la tabla 6.

Se pudo observar sustituciones en el dominio proteico 1 de la HA obtenidas durante la realización de este trabajo. Las sustituciones de aminoácidos que definen el clado 7 fueron observadas en las secuencias de HA pertenecientes a la muestra 1 y a la muestra 2 (P100S, S220T y I338V) de acuerdo a lo reportado recientemente (Nelson y cols. 2009), al igual que en trabajos anteriores realizados con muestras Uruguayas (Goñi y cols. 2010). Ambas poseían D204 en el sitio de unión al receptor importante para la transmisión del virus entre humanos (OMS 2009). La mutación D239 en el dominio de unión al receptor fue encontrada para las dos muestras de Uruguay al igual que el residuo Q310.

Durante la caracterización molecular de las secuencias del segmento génico M, la sustitución S138N en el gen que codifica la proteína M2, que se conoce que confiere resistencia a la amantadina (Dawood y cols. 2009; Shinde y cols. 2009), fue observada en una de las muestras Uruguayas analizadas, así también en todas las muestras de virus H1N1pdm, (ver figura 24).

Para el gen NA, las dos muestras de Uruguay poseían el residuo H275, un conocido marcador de sensibilidad al inhibidor de la neuraminidasa, Oseltamivir, (ver figura 25). En las secuencias del gen NA se encontraron también dos mutaciones características del clado 7, V106I y N248D, (ver tabla 6).

Durante el análisis de la secuencia codificante para la proteína NS1 se observó la mutación I123V, la cual es representante del clado 7. La proteína NS1 es la principal responsable de la evasión a la respuesta inmune que exhiben cepas previamente caracterizadas de Influenza. Sin embargo, la cepa emergente A (H1N1) de origen porcino, posee una señal de terminación en el codón 220, lo cual crea una delección en el dominio peptídico que permite su interacción con otras proteínas. De esta forma el dominio PDZ en la región C-terminal de la proteína NS1 implicado en la patogenicidad del virus H1N1 en 1918 (Jackson y cols. 2008) está ausente en todos los virus H1N1pdm y en las dos muestras de Uruguay. Por otro lado no se observó la mutación D92E conocida como un marcador de alta virulencia en humanos (Seo y cols. 2007). Para una de las muestras uruguayas se observó una mutación en el residuo L77H (ver tabla 6).



## 6. DISCUSSION

}

## **6.1 EVALUACION DEL ARN EXTRAIDO**

Durante la determinación de la calidad del ARN extraído se llevó a cabo dos procedimientos, el uso del Nanodrop y del Bioanalyzer. Las medidas de RIN para ambas muestras determinaron una mala integridad del ARN. A pesar de ello este pudo ser usado con éxito para la retrotranscripción. Los ácidos nucleicos absorben eficientemente luz ultravioleta debido a la presencia de bases aromáticas nitrogenadas a lo largo de las cadenas de DNA. La absorción de UV es una característica de la molécula de RNA, que es usada eficientemente para determinar su concentración. La no concordancia entre los datos de concentración obtenidos a partir del Nanodrop con respecto al Bioanalyzer, se podrían deber a que durante la medida en el Nanodrop tanto las moléculas de ARN intactas como las bases nitrogenadas aisladas, debido a la desintegración de la muestra, están aportando a la media de absorbancia, mientras que la concentración obtenida desde el Bioanalyzer se debe al cálculo del área del pico en la gráfica.

## **6.2 ANALISIS FILOGENETICOS Y CARACTERIZACION MOLECULAR**

Determinar la diversidad global de los virus de la Influenza A H1N1pdm es muy importante para entender la evolución y dispersión espacial y de esta forma poder predecir futuros impactos en la población humana (Nelson y cols. 2009).

Los análisis filogenéticos utilizando la secuencia de los segmentos génicos HA, NP, NA, NS y M concatenados ha revelado la presencia de 7 clados filogenéticos distintos en los virus A H1N1pdm, de acuerdo a lo reportado en estudios previos utilizando el genoma completo (Nelson y cols. 2009). Nuestros resultados muestran que la historia evolutiva de estos virus pudo ser determinada aun sin tener las secuencias de las tres polimerasas. Las dos muestras de Uruguay se agrupan en el clado 7, siendo el más predominante a nivel mundial, sin embargo la cepa vacunal recomendada para el hemisferio sur pertenece al clado 1.

Mediante el análisis de los segmentos génicos por separado, se observó que en todos los casos las muestras de Uruguay se agrupan con muestras pertenecientes al clado 7 y no capaces de diferenciar totalmente los demás clados como lo hizo el genoma completo. Estudios previos utilizando muestras de Uruguay y la región mostraron la existencia de una co-circulación de los linajes 5, 6 y 7, siendo este último el más predominante (Goñi y cols. 2010).

De la misma forma ocurre en otras partes del mundo en donde el clado 7 fue el clado detectado mayoritariamente (Nelson y cols, 2009; Potdar y cols. 2010) y siendo de esta forma el clado más distribuido globalmente. Aún queda por saber si esa predominancia se debe a una mejor capacidad replicativa del virus o se debe a una mejor transmisión del virus a humanos. Estos resultados no descartan la posibilidad de una múltiple introducción antes de la dispersión local.

El árbol correspondiente a las secuencias de HA se puede observar, de la misma forma que usando los 5 segmentos génicos concatenados que la cepa recomendada para el hemisferio sur como cepa vacunal para el año 2010 se agrupa formando un clado separado.

La variabilidad antigénica de los virus de la Influenza A es la base de las epidemias recurrentes, estos poseen sitios antigénicos cambiantes, evitando la respuesta inmune del huésped que desarrollo durante una infección previa. Las sustituciones de aminoácidos en la proteína HA que definen el clado 7 (P100I, S220T y I338V) fueron encontradas en las muestras analizadas en este estudio. Análisis anteriores han reportado que la sustitución P100I se localiza en el sitio antigénico E, mientras que la sustitución S220T se localiza en el sitio antigénico D y la sustitución I338V mapea cerca del sitio antigénico C (Deem y Pan. 2009), sugiriendo un posible rol por parte de estos cambios en la generación de variación antigénica. Ninguna de estas sustituciones se encuentra en la cepa vacunal para el hemisferio sur perteneciendo esta última al clado 1 lo que demuestra una significativa distancia genética entre de la estirpe vacunal H1N1 recomendada para la estación 2009 y las estirpes circulantes en el Uruguay. Estos resultados concuerdan con estudios realizados en el año 2010 para cepas de Sudamérica (Goñi y cols. 2010).

Las cepas de Uruguay poseen D204 en el sitio de unión al receptor, que confiere la unión del virus A H1 a los receptores de los humanos (Stevens y cols. 2004), apoyando así una eficiente transmisión de estos virus en humanos. Las cepas de Uruguay así como la mayoría de las cepas de la región (Goñi y cols.2010) poseen el residuo D239 en el dominio de unión al receptor (RBD), también encontradas en las muestras analizadas en esta tesis, mutaciones D239G/N han sido relacionadas a casos fatales (Potdar y cols.2010).

No se han observado sustituciones Q310H en las cepas estudiadas. La sustitución Q310H ha sido observada recientemente en una gran cantidad de virus aislados de pacientes que fallecieron y sus casos fueron confirmados como H1N1pdm por laboratorio (Glinsky. 2010). El residuo Q310 fue detectado en ambas muestras en estudio, corroborando la alta conservación dentro de las cepas de la región (Goñi y cols.2010).

Las sustituciones de aminoácidos relacionados a casos fatales no fueron detectadas en las muestras de Uruguay. Sin embargo tres sustituciones fueron detectadas. En la secuencia proteica de NP E127G fue detectada en la muestra 2, y A190T fue observada en la muestra 1. Por otro lado en la secuencia proteica de NS1 se observó la sustitución H77L en la muestra 1.

Según los primeros reportes tres variantes de NA del virus de Influenza A H1N1 pdm fueron identificados: el grupo de A/California/04/2009, con las variantes V106I y N248, el grupo de A/Osaka/164/2009, con I106 y N248 y el grupo de A/NewYork/18/2009, con I106 y D248 (Itoh y cols. 2009; Garten y cols. 2009). Las muestras de Uruguay pertenecen a este último grupo.

La mutación S31N en el gen M es más frecuente en virus H3N2. Se ha encontrado esta mutación en las cepas de Uruguay analizadas en este estudio así como en otras cepas del virus de la Influenza A H1N1pdm (Ramírez-González y cols. 2011). Este resultado concuerda con reportes que afirman que el gen M de la cepa pandémica deriva del gen M del virus porcino Eurasiático, el cual es resistente y pertenece al subtipo H3N2 (Chen y Shih. 2009).

La sustitución de aminoácidos en la posición 275 (H275Y) en el segmento génico NA de estirpes H1N1 pdm asociada a la resistencia a Oseltamivir no fue detectada en las cepas H1N1 pdm de Uruguay, a pesar de la circulación de cepas resistentes en la región sudamericana.

Oseltamivir ha sido el antiviral más utilizado en la reciente pandemia causada por estirpes H1N1 pdm. Sin embargo estudios más detallados como la secuenciación profunda debería ser llevado a cabo, ya que el análisis de cuasiespecies nos podría brindar mejor información en cuanto a la resistencia de estas cepas. Debido a la alta tasa de mutación, las poblaciones de virus ARN como VIA existen como nubes de variantes fuertemente relacionadas genéticamente, denominadas cuasiespecies. La unidad de selección es la población como un todo, y la naturaleza de las interacciones funcionales entre variantes es por lo tanto de importancia crítica en cuanto a la patogénesis causada en el huésped infectado. De esta forma se podrían generar virus resistentes perteneciendo a una población minoritaria dentro de la nube de cuasiespecies y por lo tanto no ser detectados analizando únicamente la secuencia consenso obtenida por PCR convencionales. Además la amplificación debe ser a partir de muestras clínicas, reduciendo las posibilidades de generación de variantes antigénicas debido a la selección en cultivos celulares (Lackemby y cols. 2008) y no de sobrenadante de cultivo celular como se realizó en este estudio. Las mutaciones esenciales permisivas V234M y R222Q en el gen NA para las cepas resistentes no fueron detectadas en las muestras de Uruguay, por lo tanto puede ser posible que la mutación H275Y no se haya dispersado globalmente en las cepas H1N1 pdm porque éstas carezcan de las mutaciones permisivas esenciales (Holmes 2010).

Las sustituciones encontradas para las muestras de Uruguay, tales como las encontradas para la muestra 1 A190T en el gen NP y L77H en la secuencia codificante de la proteína NS1, así como la encontrada para la muestra 2 A190T en el gen de NP no han sido reportadas, desconociéndose aún su función.

## **7. CONCLUSIONES**

- Se desarrollo una estrategia para la amplificación de 5 segmentos génicos del genoma del virus de Influenza A H1N1 pdm utilizando técnicas de biología molecular.
- A pesar de la mala calidad del ARN de partida y la baja concentración, se logró obtener la información genética de los segmentos génicos HA, NA, NP, M y NS, para ambas muestras, siendo las secuencias de los segmentos génicos M, NS y NP las primeras secuencias obtenidas de cepas Uruguayas de VIA H1N1 pdm.
- Los análisis filogenéticos para los segmentos génicos HA, NP, NA, NS y M concatenados mostraron ser efectivos para reconstruir la filogenia que fue reportada durante la diversificación temprana de la pandemia. Las muestras de Uruguay se agrupan en el clado 7, siendo el predominante a nivel mundial.
- A través de los análisis filogenéticos para los cinco segmentos génicos concatenados, así como para el gen HA, se pudo observar que la cepa vacunal para el año 2010 y las cepas de virus de la influenza A que circularon en Uruguay se agruparon en diferentes clados. Esto indicaría que, la cepa vacunal y las cepas de Uruguay poseen relaciones genéticas distantes entre ellas, sugiriendo de alguna manera posibles fallas durante los programas de prevención y control.
- Los análisis filogenéticos de los segmentos génicos de forma aislados no mostraron el patrón de 7 clados, aunque sí logran reconstruir la topología del clado 7. Las muestras de Uruguay se agruparon en todos los casos con cepas pertenecientes al clado 7 con altos valores de aLTR.
- Comprender las bases evolutivas para la proliferación de virus resistentes a los antivirales es importantes para poder desarrollar estrategias efectivas durante la administración de las drogas en una pandemia. A través de la caracterización molecular de los genes que codifican las proteínas de membrana como la NA y la proteína M2, se pudo determinar que las cepas de Uruguay estudiadas eran sensibles al oseltamivir y resistentes a los adamantanos.

## PERSPECTIVAS

- El estudio de cuasiespecies mediante clonación o mejor aún a través de la secuenciación profunda del genoma de influenza nos brindaría la información de la heterogeneidad de los virus de la Influenza A que existe durante la infección, de forma de mejorar la caracterización de las cepas emergentes y así evitar pandemias severas en un futuro cercano y conocer cuáles son las características claves para la emergencia de un nuevo virus pandémico. Una clara comprensión de la dinámica evolutiva viral y su relación con la resistencia a los antivirales puede facilitar el desarrollo de terapias y vacunas efectivas y apropiadas para el control de las enfermedades que estos virus causan.

## **8. LISTA DE ABREVIATURAS**

μl	Microlitros
aa	Aminoácidos
Abs	Absorbancia
ADN	Acido desoxirribonucleico
ADNc	ADN copia
ARN	Acido ribonucleico
ARNc	Copia exactamente complementaria de los ARNv
ARNm	ARN mensajero
ARNv	ARN viral
Cap	Nucleótido modificado de guanina (7 metil-guanosina)
dATPs	Desoxiadenosina- 5´ trifosfato
EDTA	Acido etilendiaminotetraacético
HA	Hemaglutinina
INF	Interferón
IPTG	Isopropil-β-D-tiogalactósido
M	Molar
M	Proteína de matriz
MDCK	Células de riñón canino Madin-Darby
MgCl <sub>2</sub>	Cloruro de Magnesio II
MgSO <sub>4</sub>	Sulfato de magnesio
ml	Mililitros
NA	Neuraminidasa
NaOH	Hidróxido de sodio
NEP/NS2	Proteína de exportación nuclear o proteína no estructural 2
nm	Nanómetros
NP	Nucleoproteína
NS	Proteína no estructural
nt	Nucleótidos
ORF	Marco abierto de lectura
PA	Polimerasa acida
pb	Pares de bases
PB1	Polimerasa básica 1
PB2	Polimerasa básica 2
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pdm	Pandémico
PKR	Proteína kinasa dependiente de RNAs
PM	Peso molecular
RNasa	Ribonucleasas
RNPv	Ribonucleoproteinas virales
RT-PC	Retrotranscripción y PCR
SDS	Dodecilsulfato de sodio

TAE	Buffer Tris-Acetato-EDTA
Tris	Tris (Hidroximetil) aminometano
UA	Unidad de absorbancia
X-Gal	5-Bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactopiranosido

## **9. AGRADECIMIENTOS**

A Juan por darme la posibilidad de realizar la pasantía de grado en el laboratorio de Virología Molecular, por sus constantes enseñanzas, así como por las oportunidades brindadas que han hecho posible gran parte de mi formación en Virología.

A Natalia, Pilar, Gonzalo y Alvaro, por toda la ayuda brindada día a día, sin la cual hubiera sido imposible la realización de este trabajo.

A Dora por aceptar corregir esta tesis en muy poco tiempo y por sus importantes aportes.

A los compañeros de laboratorio, Ricardo, Martín, Sabrina y Natalia por todas las sugerencias y aportes, por darme fuerzas cuando las cosas no salían bien y por poder ser parte de este cálido grupo de trabajo con el cual hemos compartido momentos muy agradables.

A mi familia y amigas por el amor, cariño y aliento durante toda la carrera.

## **10. BIBLIOGRAFIA**

**Albo C, Valencia A, Portela A. (1995).** Identification of an RNA binding region within the N-terminal third of the Influenza A virus NP polypeptide. *J Virol* 69: 3799-806.

**Anisimova M, Gascuel O. (2006).** Approximate likelihood ratio test for branch: A fast accurate and powerful alternative. *Syst Biol* 55:539-552.

**Avalos RT, Yu Z, Nayak DP. (1997).** Association of Influenza virus NP and M1 protein with cellular cytoskeletal element in Influenza virus- infected cel. *J Virol* 70: 2947-2958.

**Basler CF, Reid AH, Dybing JK, Janczewski TA, Faniing TG, Zheng H. (2001).** Sequence of the 1918 pandemic influenza virus nonstructural gene NS segment and characterization of recombinant viruses bearing the 1918 NS genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:2746-51.

**Baudin F, Bach C, Cusack S, Ruigrok R. (1994).** Structure of Influenza virus RNP. *Embo J* (13): 3158-65.

**Biswas S, Boutz P, Nayak D. (1998).** Influenza virus nucleoprotein interacts with influenza virus polymerase proteins. *J Virol* 72:5493-501.

**Blaas D, Patzelt E, Kuechler E. (1982).** Identification of the cap binding protein of Influenza virus. *Nucleic Acids Res* 10(15): 4803-4812.

**Bloom J, Gong L, Baltimore D. (2010).** Permissive secondary mutations enable the evolution of influenza virus oseltamivir resistance. *Science* 328:1272-1275.

**Boni M. F. (2008).** Vaccination and antigenic drift in influenza. *Vaccine* 26 (3): 8–14.

**Bright R A, Medina Mj, Xu X, y cols. (2005).** Incidence of adamantane resistance among influenza A (H3N2) virus isolated worldwide from 1994 to 2005: a cause for concern. *Lancet* 336: 1175-1181.

**Bui M, Whittaker G, Helenius A. (1996).** Effect of M1 protein and low pH on nuclear transport of Influenza virus ribonucleoprotein. *J Virol* 70: 8391-8401.

**Chen GW, Shih SR. (2009).** Genomic signatures of influenza A pandemic (H1N1) 2009 virus. *Emerg Infect Dis* 15(12):1897-1903.

**Chen BJ, Leser GP, Morita E, Lamb RA (2007).** Influenza virus hemagglutinin and neuraminidase, but not the matrix protein, are required for assembly and budding of plasmid-derived virus-like particles. *J Virol* 81:7111–7123.

**Chen W, Calvo P, Malide D, Gibbs J, Schubert U. (2001).** A novel influenza A virus mitochondrial protein that induces cell death. *Nature Med* 7: 1306-1312.

**Colman P, Varghese J, Laver W. (1983).** Structure of the catalytic and antigenic sites in influenza virus neuraminidase. *Nature* 303: 41-44.

**Cros JF, Palese P. (2003).** Trafficking of viral genomic RNA into and out of the nucleus: influenza, Thogoto and Borna disease viruses. *Virus Res* 95(1-2): 3-12.

**Dauber B, Heins G, Wolff T. (2004).** The Influenza B virus nonstructural NS1 protein is essential for efficient viral growth and antagonizes beta interferon induction. *J Clin Virol* 78: 1865-1872.

**Dawood F, Jain S, Finelli L. (2009).** Emergence of a novel swine-origin influenza A (H1N1) virus in humans. *N Engl J Med* 360 (25): 2605-2615.

**Deem MW, Pan K. (2009).** The epitope region of H1-subtype influenza A, with application to vaccine efficacy. *Protein Eng Desing Select* 9: 543-546.

**De Jong JC, Rimmelzwan GF, Fouchier RA, Osterhaus AD. (2000).** Influenza virus: a master of metamorphosis. *Infect* 40: 428-433.

**Dharam NJ, Gubareva LV, Meyer JJ, Okomo- Adhiambo M, McClinton RC, Marshall SA (2008).** Infection with oseltamivir resistant influenza A (H1N1) virus in the United States. *JAMA* 301:1034-1041.

**Digard P, Blok V, Inglis S. (1996).** Complex formation between influenza virus polymerase proteins expressed in *Xenopus* oocytes. *Virology* 216: 326-337.

**Elton D, Medcalf L, Bishop K, Harrinson D, Digard P. (1999).** Identification of amino acid residues of influenza virus nucleoprotein essential for RNA binding. *J Virol* 73(9): 7357-7367.

**Ennis FA, Rook AH, Qi YH, Schild GC, Riley D, Pratt R, Potter CW. (1981).** HLA restricted virus-specific cytotoxic T-lymphocyte responses to live and inactivated influenza vaccines. *Lancet* 2(8252): 887-891.

**Falcon A, Fortes P, Marion R, Beloso A, Ortin J. (1999).** Interaction of influenza virus NS1 protein and the human homologue of stauferin in vivo and in vitro. *Nucleic Acid Res* 27: 2241-2247.

**Fechter P, Brownlee GG (2005).** Recognition of mRNA cap structures by viral and cellular proteins. *J Gen Virol* 86:1239-1249.

**Felsenstein J.(1985).** Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 39:783-791.

**Fernandez-Sesna A. (2007).** The Influenza virus NS1 protein: inhibitor of innate and adaptative immunity. *Infect Disord Drug Targets* 7(4): 336-343.

**Fodor E, Pritlove D C, Brownlee GG. (1994).** The Influenza virus panhandle is involved in the initiation of transcription. *J Virol* 68: 4092-4096.

**Fouchier RA, Munster V, Wallenstein A y cols. (2005).** Characterization of a novel Influenza A virus hemagglutina subtype (H16) obtained from black-headed in mice. *J Virol* 79(5): 2814-22.

**Glinsky G V. (2010).** Genomic analysis of pandemic (H1N1) 2009 reveals association of increasing disease severity with emergence of novel hemagglutinin mutations. *Cell Cycle* 9: 958-970.

**Gamblin S, Skehel J. (2010).** Influenza hemagglutinin and neuraminidase glycoproteins. *J Biol Chem* 285(37): 28403–28409.

**Garcia-Sastre A, Egorov A, Matassov D, Brandt S, Levy D E, Durbin J E, Palese P, and Muster T. (1998).** Influenza A virus lacking the NS1 gene replicates in interferon-deficient systems. *Virol* 252(2): 324-30.

**Garten R, Davis C, Russell C. (2009).** Antigenic and genetic characteristics of swine origin 2009 (H1N1) influenza viruses circulating in humans. *Science* 325 (5937):197-201.

**Garten W, Klenk H. (1999).** Understanding influenza virus pathogenecity. *Trends Microbiol* 7(3): 99-100.

**Glezen W. (1996).** Emerging infections: pandemic influenza. *Epidemiol Rev* 18(1):64-76.

**Glezen W, Payne A, Snyder D, Downs T. (1982).** Mortality and Influenza. *J. Infect Dis* 146: 313-321.

**Goñi N, Moratorio G, Rama V, Coppola L, Chiparelli H, Cristina J. (2010).** Phylogenetic analysis of pandemic 2009 influenza A virus circulating in South American region: genetic relationships and vaccine strain match. *Arch Virol* 156:87-94.

**Goñi N, Russi J, Cristina J. (2009).** Human Influenza A viruses isolated in South America: genetic relations, adamantane resistance and vaccine strain match. *Infection, Genetics and Evolution* 9(2): 229-234.

**Goñi N, Baz M, Ruchansky D, Cópola L, Russi J, Cristina J. (2007).** Influenza B viruses isolated in Uruguay during 2002-2005 seasons: genetic relations and vaccine strain match. *Virus Research* 123(1): 100-104.

**Green J, Charette P, Yeh T, Smith C. (1982).** Presence of interferon in acute and convalescent phase sera of humans with influenza or an influenza-like illness of undetermined etiology. *J Infect Dis* 145:837-841.

**Gubareva L. (2004).** Molecular mechanisms of influenza virus resistance to neuraminidase inhibitors *Virus Res* 103:199-203.

**Guindon S, Lethiec F, Duroux P, Gascuel O. (2005).** PHYML Online—a web server for fast maximum likelihood-based phylogenetic inference. *Nucleic Acids Res* 33:W557–W559.

**Gutierrez EB, Li HY, Santos AC, Lopes MH. (2001).** Effectiveness of influenza vaccination in elderly outpatients in São Paulo city, Brazil. *Rev Inst Med trop. Sao. Paulo* 43(6): 317.320.

**Hak E, Buskens E, van Essen GA, de Bakker DH, Grobbee DE, Tacke MA, van Hout BA, Verheij TJ. (2005).** "Clinical effectiveness of vaccination in persons younger than 65 years with high-risk medical conditions: the PRISMA study". *Archives of Internal Medicine* 165(3): 274–280.

**Hale BG, Randall RE, Ortin J, Jackson D. (2008).** The multifunctional NS1 protein of Influenza A viruses. *J Gen Virol* 89(10): 2359-2376.

**Hay A, Wolstenholme A, Skehel J, Smith M. (1985).** The molecular basis of the specific anti-influenza action of amantadine. *Embo J* 4: 3021-3024.

**Haye K, Burmakina S, Muran T, Garcia-Sastre A, Fernandez-Sesna A. (2009).** The NS1 protein of human Influenza virus inhibits type I interferon production and the introduction of

antiviral responses in primary human dendritic and respiratory epithelial cells. *J Virol* 83(13): 6849-6862.

**Hill D, Baron S, Perkins J, Worthington M, van Kirk J, Mills J, Kapikian A, Chanock R. (1972).** Evaluation of an interferon inducer in viral respiratory disease. *JAMA* 219: 1179- 84.

**Hillerman MR. (2002).** Realities and enigmas of human virus influenza: pathogenesis, epidemiology and control. *Vaccine* 20:3068-3087

**Holmes E. (2010).** Helping the resistance. *Science* 328(5983): 1243-1244.

**Holmes E. (2009).** RNA virus genomics: a world of possibilities. *J Clin Invest* 119(9): 2488-2495.

**Holmes E, Ghedin E, Miller N, Taylor J, Bao Y. (2005).** Whole genome analysis of human influenza A virus reveals multiple persistent lineages and reassortment among recent H3N2 viruses. *Plos Biol* 3(9): e300.

**Holsinger L, Lamb R. (1991).** Influenza virus M2 integral membrane protein is a homotetramer stabilized by formation of disulfide bonds. *Virology* 183:32-43.

**Itoh Y, Shinya K, Kiso M. (2009).** In vitro and in vivo characterization of new swine-origin H1N1 influenza viruses. *Nature* 460:1021-5.

**Jackson D, Hossain MJ, Hickman D, Perez DR, Lamb RA. (2008).** A new Influenza virus virulence determinant: the NS1 protein four C-terminal residues modulate pathogenicity. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:4381-4386.

**Jhung MA, Swerdlow D, Ossen SJ y cols. (2011).** Epidemiology of 2009 pandemic Influenza A (H1N1) in the United States. *Clinical Infectious Diseases* 52(1): 13-26.

**Jia D, Rahbar R, Chan R W Y, Lee S M Y y cols. (2010).** Influenza virus non-structural protein 1 (NS1) disrupt interferon signaling. *PloS ONE* 5(11): e13927.

**Kawaoka Y. (2001).** Influenza viruses. *Encyclopedia of life sciences*. 1-10.

**Kawaoka Y, Krauss S, Webster RG. (1989).** Avian to human transmission of the PB1 gene of influenza A viruses in the 1957 and 1968 pandemics. *J Virol* 63(11):4603-8.

**Klenk H, Rott R, Orlich M, Bledoen J. (1975).** Activation of Influenza A viruses by tripsin treatment. *Virology* 68:426-439.

**Krug RM, Alonso-Caplen FV, Julkunon I, Katze MG. (1989).** Expression and replication of the Influenza virus genome. *The Influenza virus* Plenum Press, New York 89-152.

**Lamb R, Holsinger L, Pinto L (1994).** The influenza A virus M2 ion channel protein and its role in the influenza virus life cycle In: Wimmer, E, ed. *Receptor-Mediated Virus Entry into Cells*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Press 303-321.

**Lamb R, Zebedee S, Richardson C. (1985).** Influenza virus M2 protein is an integral membrane protein expressed on the infected cell surface *Cell* 40: 627-33.

**Lamb R, Choppin P, Chanock R. (1980).** Mapping of the two overlapping genes for polypeptides NS1 and NS2 on RNA segment 8 of influenza virus genome. *Proc Natl Acad Sci USA*. 77 (4): 1857-61.

**Lackemby A, Democratis J, Siqueira M, Zambon M. (2008).** Rapid quantitation of neuraminidase inhibitor drug resistance in influenza virus quasiespecies. *Antivir Ther* 13 (6):809-20.

**Laver WG, Bischofberger N, Webster RG. (1999).** Disarming flu viruses. *Sci Am* 280(1): 78-87.

**Li Y, Yamakita Y, Krug R. (1998).** Regulation of a nuclear export signal by an adjacent inhibitory sequence: the effector domain of the influenza NS1 protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:4864-9.

**Liu C, Eichelberger MC, Compans RW, Air GM. (1995).** Influenza type A virus neuraminidase does not play a role in viral entry, replication, assembly or budding. *J Virol* 69:1099.

**Louie J, Acosta M, Winter K. (2009).** Factors associated with death or hospitalization due to pandemic 2009 influenza A (H1N1) infection in California. *JAMA* 302:1896-902.

**Mamun MM, Huda AK. (2010).** Origins and evolutionary genomics of the novel swine-origin Influenza A (H1N1) virus in humans--past and present perspectives. *Yakugaku Zasshi* 131(4):553-62.

- McHardy A, Adams B. (2009).** The role of genomics in tracking the evolution of influenza A virus. *Plos Path* 5: e1000566.
- McKimm-Breschkin JL. (2005).** Management of influenza virus infections with neuraminidase inhibitors: detection, incidence, and implication of drug resistance. *Treat Respir Med* 4(2): 107-116.
- Memoli M, Jagger B, Dugan V, Jadon L, Taubenberger K. (2009).** Recent human influenza A/H3N2 virus evolution driven by novel selection factors in addition to antigenic drift. *L Infect Dis* 200(8):1232-1241
- Moscona A. (2005).** Neuraminidase inhibitors for influenza. *N Engl J Med* 353 (13): 1363- 73.
- Mould J, Li H, Dudlak C, Lear J, Pekoz A, Lamb R, Pinto L. (2000).** Mechanism for proton conduction of the M2 ion channels of influenza A virus. *J Biol Chem* 275:8592-9.
- Nakajima K, Desselberger U, Palese P. (1978).** Recent influenza A (H1N1) viruses are closely related genetically to strains isolated in 1950. *Nature* 274:334-339.
- Nayak D, Hui E K, Barman S. (2004).** Assembly and budding of influenza virus. *Virus Res* 106(2): 147-165.
- Nayak D. (1994).** Influenza virus infections. *Encyclopedia of human biology* 5: 67-80.
- Nelson M, Spiro D, Wentworth D, Beck E, Fan J. (2009).** The early diversification of influenza A/H1N1pdm. *Plos Curr Influenza* 1: RRN1126.
- Nelson M, Viboud C, Simonsen L, Bennett R, Gieseher S, George K, Taylor J, Spiro D, Sengamalay N, Ghedin E, Taubenberger J, Holmes E. (2008).** Multiple reassortment events in the evolutionary history of H1N1 influenza A virus since 1918. *PLOS Pathog* 4(2): 1000012
- Nelson M, Simonsen L, Viboud C, Miller M, Taylor J, George K, Gieseher S, Ghedi E, Sengamalay N, Spiro D, Grenfell B, Lipman D, Taubenberger J, Holmes E. (2006).** Stochastic processes are key determinants of short-term evolution in influenza A virus. *PLOS Pathog* 2(12): e125.
- Neumann G, Noda T, Kawaoka Y. (2009).** Emergence and pandemic potential of swine origin H1N1 influenza virus. *Nature* 459 (7249): 931-939.

**Neumann G, Hughes M, Kawaoka Y. (2000).** Influenza A virus NS2 mediates RNPv nuclear export through NES-independent interaction with hCRM1. *Embo J* 19:6751-8.

**Neumann G, Castrucci MR, Kawaoka Y. (1997).** Nuclear import and export of Influenza virus nucleoprotein. *J Virol* 71:9690-9700.

**Nichol K L, Nordin J D, Nelson, D.B, Mullooly J D and Hak, E. (2007).** Effectiveness of Influenza Vaccine in the community-dwelling elderly. *The New England Journal of Medicine* 357(14): 1373-1381.

**Novel Swine-Origin Influenza A (H1N1) Investigation Team. (2009).** Emergence of a novel Swine-Origin Influenza A (H1N1) virus in human. *N. Engl. J Med* 360: 2605-2615.

**OMS. (2010a)** H1N1: El mundo se adentra en el periodo post-pandémico [http://www.who.int/mediacentre/news/statements/2010/h1n1\\_vpc\\_20100810/es/](http://www.who.int/mediacentre/news/statements/2010/h1n1_vpc_20100810/es/)

**OMS. (2010b).** Weekly update on oseltamivir resistance to pandemic influenza A (H1N1) 2009 viruses <http://www.who.int/csr/disease/swineflu/oseltamivirresistant20100416.pdf>

**OMS. (2010c).** Pandemic H1N1 2009-Update 101. Weekly update. Disponible en [http://www.who.int/csr/don/2010\\_05\\_21/en/index.html](http://www.who.int/csr/don/2010_05_21/en/index.html).

**OMS. (2009a).** World now at the start of 2009 influenza pandemic. [http://www.who.int/mediacentre/news/statements/2009/h1n1\\_pandemic\\_phase6\\_20090611/en/index.html](http://www.who.int/mediacentre/news/statements/2009/h1n1_pandemic_phase6_20090611/en/index.html)

**OMS. (2009b).** Pandemic (H1N1): update 76. Disponible en: [http://www.who.int/csr/don/2009\\_11\\_27a/en/index.html](http://www.who.int/csr/don/2009_11_27a/en/index.html).

**OMS. (2006).** Recommended composition of influenza vaccines for use in the 2006-2007 influenza season.

**Paglioni S. (1999).** Estructura y función de los virus. En: virus receptores y co-receptores celulares ed. CTM Serv.Bib.S.A.Buenos Aires, pp 45-97.

**Palese P, Shaw M. (2007).** Orthomyxoviridae: The Virus and their replication. En: Knipe D M, Holey P M (Eds). *Field Virology*, 5th ed. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia P A, PP. 1648-1689.

**Palese P, Tobita K, Ueda M y cols. (1974).** Characterization of temperature sensitive Influenza virus mutants defective in neuraminidase. *Virology* 61(2): 397-410.

**Patterson K. (1986).** Pandemic Influenza 1700-1900: a study in historical epidemiology. Rowman and Littlefield: New Jersey.

**Pensaert M, Ottis K, Vandeputte J, Kaplan MM, Bachmann PA. (1981).** Evidence for natural transmission of Influenza A virus from wild duck to swine and its potential importance for man. *Bull World Health Organ* 59(1): 75-78.

**Perales B, Sanz-Ezquerro J, Gastaminza P, Ortega J, Fernandez J, Ortin J, Nieto A. (2000).** The replication activity of influenza virus polymerase is linked to the capacity of the PA subunit to induce proteolysis. *J Virol* 74:1307-12.

**Poch O I, Sauvaget M, Delarue, Tardo. (1989).** Identification of four conserved motifs among the RNA-dependent polymerase encoding element. *EMBO J* 8:3867-3874.

**Potdar VA, Chadha MS, Jadhav SM, Mullick J, Cherian SS y cols. (2010).** Genetic characterization of the Influenza A Pandemic (H1N1) 2009 virus isolates from India. *PLoS ONE* 5:e9693

**Rambaut A, Pybus O, Nelson M, Viboud C, Taubenberger J. (2008).** The genomic and epidemiological dynamics of human influenza A virus. *Nature* 453: 615-619.

**Ramírez-González JE, González-Duran E, Alcántara-Pérez P, Wong-Arambula C y cols. (2011).** Oseltamivir resistant Pandemic (H1N1) 2009 virus, Mexico. *Emerg Infect Dis* 17(2): 283-286.

**Resa-Infante P, Jarba N, Coloma R y Ortin J. (2011).** The influenza RNA Synthesis machine. Advances in its structure and function. *RNA Biology* 8: 207-215.

**Roberts PC, Lamb RA, Compans RW (1998).** The M1 and M2 proteins of influenza A virus are important determinants in filamentous particle formation. *Virology* 240(1): 127-137.

**Robertson J S, Schubert M, Lazzarini R A, (1981).** Polyadenylation site for Influenza virus RNA. *J Virol* 38(1): 157-163.

Robertson J S. (1979). **5' and 3' terminal nucleotide sequences of the RNA genome segments of influenza virus.** *Nucleic Acid Res* 6(12):3745-3757.

**Rogers G, Paulson J. (1983).** Receptor determinants of human and animal influenza virus isolates: differences in receptor specificity of the H3 hemagglutinin based on species of origin. *Virology* 127 (2): 361-73.

**Rossman J, Lamb, R. (2011).** Influenza virus assembly and budding. *Virology* 411(2): 229-236.

**Scholtissek C, von Hoyningen V, Rott R. (1978).** Genetic relatedness between the new 1977 epidemic strains (H1N1) of influenza and human influenza strains isolated between 1847 and 1957 (H1N1). *Virology* 89 (2):613-17.

**Schroeder C, Heider H, Moncke-Buchner E, y cols. (2005).** The influenza virus ion channel and maturation cofactor M2 is a cholesterol-binding protein. *Eur Biophys J* 34(1): 52-66.

**Seo SH, Hoffmann E, Webster RG. (2007).** Lethal H5N1 Influenza virus escape host antiviral cytokine receptor. *Nat Med* 8: 950-954.

**Sha B, Luo M. (1997).** Structure of a bifunctional membrane-RNA binding protein, influenza virus matrix protein M1. *Nat Struct Biol* 4:239-44.

**Sheu TG, Deyde VM, Okomo- Adhiambo M, Garten RJ, Xu X, Bright RA y cols (2009).** Surveillance for neuraminidase inhibitor resistant among influenza A y B viruses circulating worldwide from 2004 to 2008. *Antimicrobial Agent Chemother* 52:3284-3292.

**Shinde V, Bridges C, Uyeki T. (2009).** Triple-reassortant swine influenza A (H1) in humans in the United States, 2005-2009. *N Engl J Med* 360(25), 2616-25.

**Simonsen L, Taylor R J, Viboud C, Miller, M.A, and Jackson L.A. (2007).** Mortality benefits of influenza vaccination in elderly people: An ongoing controversy. *The Lancet Infectious Diseases* 7: 658-666.

**Simonsen L. (2007).** Commentary: Observational studies and the art of accurately measuring influenza vaccine benefits. *Int J Epidemiology* 36(3): 631-632.

**Slemons RD, Johnson DC, Osborn JS, Hayers F. (1974).** Type A Influenza viruses isolated from wild free-flying-duck in California. *Avian Dis* 18:119-124.

**Smith D, Lapedes A, de Jong J, Bestebroer T, Rimmelzwann G. (2004).** Mapping the antigenic and genetic evolution of influenza virus. *Science* 305: 371-376.

**Smith G, Bahl J, Vijaykrishna D, Zhang J, Poon LLM, Chen H, Webster RG, Malik Js, Guan Y. (2009).** Dating the emergence of pandemic influenza virus. *Proc Natl Acad Sci.* 106: 11709-11712.

**Smith G, Vijaykrishna D, Bahl J, Lycett S, Worobey M, Pybus O, Kit Ma S, Cheung C, Ragwani J, Bhatt S, Malik Peiris J, Guan Y, Rambaut A. (2009).** Origins and evolutionary genomics of the 2009 swine origin H1N1 influenza A epidemic. *Nature* 459(7250):1122-5.

**Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. (1977).** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74(12): 5463–5467.

**Smith RD, Lapedes A, de Jong J, Bestebroer T, Rimmelzwann G. (2004).** Mapping the antigenic and genetic evolution of influenza virus. *Science.* 305: 371-376.

**Stegmann T (2000).** Membrane fusion mechanisms: the influenza hemagglutinin paradigm and its implications for intracellular fusion. *Traffic* 1(8):598-604.

**Steinhauer DA. (1999).** Role of hemagglutinin cleavage for the pathogenicity of influenza virus. *Virol* 258 (1): 1-20.

**Stevens J, Corper AL, Basler CF, Taubenberger JK, Palese P y cols. (2004).** Structure of the uncleaved human H1 hemagglutinin from the extinct 1918 influenza virus. *Science* 303: 1866–1870

**Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., and Kumar S. (2011).** MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution* (In Press).

**Tang JW, Shetty N, Hon KL. (2010).** Emerging, novel and known Influenza in human. *Infect Dis Clin N Am.* 24:603-617.

**Taubenberger JK, Kash JC. (2010).** Influenza virus evolution, host adaptation and pandemic formation. *Cell Host and Microbe.* 7: 440-451.

**Taubenberger JK, Morens DM. (2010).** Influenza: The once and the future pandemic. *Public Health Rep* 124(3): 16-26.

**Taubenberger JK. (2006).** Influenza hemagglutinin attachment to target cell: binds to do it, we do it. *Future Virol* 1:415-418.

**Taubenberger JK, Reid A, Janczewski T, Fanning T. (2001).** Integrating historical, clinical and molecular data in order to explain the origin and virulence of the 1918 Spanish influenza virus. *Philos Trans R Soc Lond B* 356:1829-39.

**Thompson J, Higgins D, Gibson T. (2004).** CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acid Res* 22, 4673-4680.

**Trifonov V, Khiabani H, Greenburg B, Rabadan R. (2009).** The origin of the recent swine influenza A (H1N1) virus infecting humans. *Euro Surveill* 14 (17): pii 19193.

**Van Voris L, Newell P. (1992).** Antiviral for the chemoprophylaxis and treatment of influenza. *Semin Respir Infect* (7), 61-70.

**Wang C, Takeuchi L, Pinto L, Lamb R. (1993).** Ion channel activity of influenza A virus M2 protein: characterization of the amantadine block. *J Virol* 67:5585-5594.

**Weber F, Koch G, Gruber S, y cols. (1998).** A classical bipartite nuclear localization signals on Thogoto and Influenza A virus nucleoprotein. *Virol* 250(1): 9-18.

**Webster RG, Bean WJ, Gorman OT, Chambers TM, Kawaoka Y. (1992).** Evolution and ecology of influenza A viruses. *Microbiol Rev* 56: 152-179.

**Webster RG, Brown L, Laver W. (1984).** Antigenic and biological characterization of influenza virus neuraminidase (N2) with monoclonal antibodies. *Virol* 135 (1): 30-42.

**Webster RG, Laver WG, Air GM, Schild GC. (1982).** Molecular mechanisms of variation in Influenza viruses. *Nature* 296:115-121.

**Whight P F, Neumann G, Kawaoka Y. (2007).** Orthomyxoviruses. En: Knipe D M, Hooley P M (Eds) *Fields Virology*, 5th ed. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia PA, pp. 1692-1740.

**Wolf YI, Vibound C, Holmes EC, Lipman DJ. (2006).** Long interval of stasis punctuated by burst of positive selection in the seasonal evolution of influenza A virus. *Biol Direct* 1: 34.

**Wu CY, Jeng KS, Lai MM. (2011).** The SUMOylation of matrix protein modulate the assembly and morphogenesis of Influenza A virus. *J Virol* 83(13): 6618- 6628.

**Yamada AY, Meager A, Yamada A, Ennis F. (1986).** Human interferon alpha and gamma production by lymphocytes during the generation of influenza virus-specific cytotoxic T lymphocytes. *J Gen Virol* 67:2325-2334.

**Younkin S, Betts R, Roth F, Douglas R. (1983).** Reduction in fever and symptoms in young adults with influenza A/Brazil/78 H1N1 infection after treatment with aspirin or amantadine. *Antimicrob Agents Chemother* 23: 577-82.

**Yang J, Lin Y, Huang Y, Su C, Lo J, Ho Y, Yao C, Hsu L, Wu H, Liu M. (2011).** Reassortment and mutations associated with emergence and spread of oseltamivir resistant seasonal influenza A-H1N1 viruses in 2005-2009. *Plos One* 6: e18177.

**Yuan W, Krug RM. (2001).** Influenza B virus NS1 protein inhibits conjugation of the interferon (IFN) induced ubiquitin-like ISG15 protein. *EMBO J* 20: 362-371.

**Zhang J, Pekoz A, Lamb RA (2000).** Influenza virus assembly and lipid raft micro domains: a role for the cytoplasmic tails of the spike glycoproteins. *J Virol* 74 (10):4634-4644.



