

Licenciatura en Bioquímica
Facultad de Ciencias
Universidad de la república

Variabilidad genética del virus Influenza A H3N2 circulante en Uruguay en la temporada invernal 2011-2012

Martín Sóñora
Laboratorio de Virología Molecular
Centro de Investigaciones Nucleares
Facultad de Ciencias

Orientador: Dra. Pilar Moreno

Co-orientador: Dr. Gonzalo Moratorio

Índice

Agradecimientos

Abreviaturas	6
1.Resumen	9
2.Introducción	10
2.1. La Enfermedad.....	10
2.1.1. Epidemiología y patogénesis.....	10
2.1.2. Prevención y control de la enfermedad.....	11
2.1.2.1. Vacunas.....	11
2.1.2.2. Drogas Antivirales.....	13
2.2. El virus de Influenza.....	15
2.2.1. Clasificación y Nomenclatura.....	15
2.2.2. Morfología y Estructura del Virión.....	16
2.2.3. Organización del Genoma y sus proteínas codificantes.....	18
2.2.3.1. Polimerasas.....	22
2.2.3.2. Hemaglutinina.....	23
2.2.3.3. Nucleoproteína.....	24
2.2.3.4. Neuraminidasa.....	25
2.2.3.5. Matriz.....	25
2.2.3.6. Proteínas no estructurales.....	27
2.2.4. Ciclo Replicativo de VIA.....	28
2.2.4.1. Adsorción y Penetración.....	28
2.2.4.2. Transcripción y Traducción.....	29
2.2.4.3. Replicación.....	29
2.2.4.4. Ensamblaje y Brotamiento.....	30
2.3. Mecanismos de Variabilidad Genética.....	32
2.4. Epidemiología del virus de Influenza A.....	35
2.5. Virus de la Influenza A subtipo H3N2.....	38

3.Objetivos	43
3.1. Objetivo General.....	43
3.2. Objetivos Específicos.....	43
4.Materiales y Métodos	44
4.1. Muestras.....	44
4.2. Extracción de ARN.....	46
4.3. Evaluación de la cantidad y calidad del ARN.....	46
4.4. Transcripción Reversa (TR).....	46
4.5. PCR para GAPDH.....	47
4.6. Diseño de Oligonucleótidos específicos para la amplificación de los genes HA y NA de Influenza A H3N2.....	47
4.7. Reacción en cadena de la polimerasa para los genes HA y NA.....	49
4.8. Electroforesis en gel de agarosa.....	51
4.9. Purificación de los productos de PCR.....	51
4.10. Secuenciación.....	52
4.11. Análisis de secuencias.....	52
4.11.1. Análisis Filogenéticos.....	52
4.12. Estudios Bayesianos de Coalescencia.....	53
5.Resultados	55
5.1. Puesta a punto de la amplificación mediante RT-PCR de los segmentos génicos HA y NA de VIA H3N2.....	55
5.2. Identificación y caracterización de las cepas de Virus Influenza A H3N2 de las muestras obtenidas en Uruguay durante la temporada invernal 2011-2012.....	56
5.3.Determinación de las relaciones filogenéticas entre las estirpes circulantes en Uruguay y en diferentes regiones geográficas respecto a la cepa vacunal.....	65
5.5. Determinar polimorfismos asociados a resistencia a antivirales.....	68
5.4.1. Resistencia a Adamantanos.....	68
5.4.2. Resistencia a inhibidores de Neuraminidasa.....	65

5.5. Análisis de la dinámica poblacional del virus de influenza A H3N2 mediante abordajes bayesianos de coalescencia.....	72
6.Discusión.....	77
6.1. Puesta a punto de la amplificación de los genes HA y NA de VIA H3N2 y caracterización de cepas de VIA circulantes en la temporada invernal 2011-2012.....	77
6.2. Determinación de las relaciones filogenéticas entre las estirpes circulantes en Uruguay y en diferentes regiones geográficas respecto a la cepa vacunal.....	78
6.3. Determinación de polimorfismos asociados a resistencia a antivirales.....	79
6.4. Dinámica poblacional del Virus de Influenza A H3N2 mediante abordajes bayesianos de coalescencia.....	81
7.Conclusión.....	83
8.Perspectivas.....	84
9. Referencias Bibliográficas.....	84

Agradecimientos

Quiero agradecer profundamente:

Al Dr. Juan Cristina, por haberme dado la oportunidad y confianza de realizar la pasantía de grado en su laboratorio; por sus enseñanzas, como ser la importancia del trabajo en equipo, y por su constante disponibilidad a la hora de discutir los temas del laboratorio que tanto nutren mi formación en Virología.

A la Dra. Pilar Moreno y al Dr. Gonzalo Moratorio por aceptarme como su estudiante de grado; por la dedicación brindada y la gran disposición y paciencia que tuvieron.

Al MSc. Álvaro Fajardo, por toda la ayuda brindada día a día, sin la cual hubiera sido imposible la realización de este trabajo.

A Dora por la disponibilidad y amabilidad al aceptar corregir esta tesis.

A mis compañeros del laboratorio, Álvaro, Victoria, Sabrina, Natalia y Ricardo por todo su apoyo diario, compañerismo y por generar un ambiente tan agradable en el laboratorio.

A mi novia, Fabiana por su comprensión y apoyo constante.

A mi familia: mis padres, mis hermanos, abuelos, tíos y primos por su apoyo constante, su cariño, preocupación y por estar siempre conmigo durante el transcurso de la carrera.

A mis amigos que siempre estuvieron y siguen estando presentes.

A la Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII, Uruguay), por el apoyo económico brindado, otorgándome la Beca de Iniciación a la Investigación para poder llevar a cabo la pasantía de grado.

A Bienestar Universitario y Fondo de Solidaridad, por la ayuda brindada durante gran parte de la carrera, sin la cual hubiera sido imposible culminar en tiempo y forma.

A la Asociación Española Primera de Socorros Mutuos, por la disponibilidad a la hora de la obtención de muestras.

Abreviaturas

aa	Aminoácidos
Abs	Absorbancia
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ADNc	ADN copia
ARN	Ácido Ribonucleico
ARNc	Copia complementaria de los ARNv
ARNm	ARN mensajero
ARNv	ARN viral
Cap	Nucleótido modificado de guanina (7 metil-guanosina)
dNTPs	Desoxinucleótidos-5´trifosfato
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Acido etilenaminotetraacético
GAPDH	Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa
HA	Hemaglutinina
IHA	Inhibición de la Hemaglutinación
INA	Inhibidores de NA
INF	Interferón
Kda	Kilo Dalton
M	Molar

M1	Proteína de Matriz
M2	Proteína Canal Iónico
MgCl ₂	Cloruro de Magnesio II
mL	Mililitros
MRCA	Ancestro Común Más Reciente
NA	Neuraminidasa
NaOH	Hidróxido de Sodio
NEP/NS2	Proteína de exportación nuclear o preoteína no estructural 2
Nm	Nanómetros
NP	Nucleoproteína
NS	Proteína no estructural
nt	Nucleótidos
ORF	Marco abierto de lectura
OMS	Organización Mundial de la Salud
PA	Polimerasa Ácida
pb	Pares de bases
PB1	Polimera Básica 1
PB2	Polimera Básica 2
PCR	Reacción en cadena de la Polimerasa
pdm	Pandémico

PKR	Proteína Kinasa dependiente de RNAs
PM	Peso molecular
RNasa	Ribonucleasas
RNPv	Ribonucleoproteínas virales
RT-PCR	Retrotranscripción y PCR
s/s/a	sustituciones por sitio por año
TAE	Buffer Tris-Acetato-EDTA
Tm	Temperatura de melting
Tris	Tris (Hidroximetil) aminometano
UA	Unidades de Absorbancia
μL	Microlitro
μM	Micromolar
UV	Ultra-Violeta
VIA	Virus Influenza A
VIB	Virus Influenza B
VIC	Virus Influenza C
°C	Grados Celsius

1. Resumen

Los virus Influenza pertenecen a la familia *Orthomyxoviridae*. Estos son virus envueltos cuyo genoma está constituido por ARN de cadena simple de polaridad negativa y se caracterizan por tener un genoma segmentado. De los 3 tipos conocidos de Influenza: A, B y C, solo los tipos A y B ocasionan frecuentemente enfermedades severas en humanos. Los virus Influenza tipo A están ampliamente distribuidos en la naturaleza, infectan una gran variedad de especies de animales como cerdos, caballos, mamíferos acuáticos y aves, aunque no todas las cepas infectan a todas las especies, incluyendo los seres humanos. Este virus causa entre 300.000 y 500.000 muertes anuales a nivel mundial y en los años de pandemia este número se puede incrementar a 1 millón o hasta 50 millones como se observó en la pandemia de 1918.

Cambios frecuentes en la composición genética y antigénica constituyen la base de las epidemias y pandemias a nivel mundial.

Durante el año 1968 emergió un nuevo virus humano subtipo H3N2 pandémico causante de la llamada “gripe de Hong Kong”. El virus fue generado por reordenamiento génico entre un virus humano H2N2 y uno de origen aviar H3N?, introduciendo a la población humana la H3 y PB1 de origen aviar. Desde ese entonces el subtipo H3N2 ha estado circulando, causando morbilidad y mortalidad en sucesivas epidemias.

La forma más efectiva de reducir la morbilidad y mortalidad del virus de la Influenza es mediante la vacunación anual de personas con alto riesgo de complicaciones asociadas al virus. La eficacia de cualquier vacuna contra la gripe depende de cuan estrechamente relacionadas estén las cepas de la vacuna con las cepas en circulación. Se han diseñado drogas antivirales a fin de controlar el desarrollo de la enfermedad.

En el presente trabajo estudiamos el grado de variabilidad genética y antigénica del virus Influenza A H3N2 circulante en nuestro país durante la temporada invernal 2011-2012 y se comparó el mismo con la cepa vacunal recomendada por la OMS para nuestro hemisferio en esos años. Asimismo estudiamos la presencia de cambios aminoacídicos característicos que definen cepas resistentes a antivirales. Por último se utilizó una aproximación Bayesiana Monte Carlo con Cadenas de Markov para analizar secuencias del gen HA con el objetivo de estimar las tasas y patrones evolutivos de este virus desde el año 2006 hasta la actualidad.

2. Introducción

2.1. La Enfermedad

2.1.1. Epidemiología y patogénesis

La Influenza A o gripe es una enfermedad respiratoria caracterizada por ser altamente contagiosa. Esta enfermedad causa entre 300.000 y 500.000 muertes anuales en el mundo y en los años de pandemia este número se puede incrementar a 1 millón o hasta 50 millones como se observó en la pandemia de 1918 (Nguyen-Van-Tam y Hampson 2003; Holmes 2009). El agente causante de esta enfermedad es el Virus de Influenza A (VIA). Éste virus presenta un período de incubación de uno a cuatro días, dependiendo en gran medida de la carga viral y del estado inmunitario del hospedero. Las células blanco primarias de los virus son las células 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. También puede presentarse como neumonías, principalmente en personas mayores con enfermedades crónicas, lo cual genera casos más graves y a veces fatales. 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 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. Por otro lado, en regiones tropicales dicha temporada es anual. 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).

2.1.2. Prevención y control de la enfermedad

2.1.2.1. Vacunas

La forma más efectiva de reducir la morbi-mortalidad por el virus de la Influenza es a través de la implementación de programas de vacunación anual de personas con alto riesgo de complicaciones asociadas al virus. En oposición a lo que ocurre en algunas enfermedades prevenibles con vacuna, la endemidad mundial del virus de la Influenza, la persistencia de sus reservorios animales y principalmente su naturaleza altamente cambiante, convierten al virus de la gripe en un blanco inapropiado de erradicación. Sin embargo, durante los últimos 50 años han estado disponibles vacunas contra la enfermedad y la existencia de una red de vigilancia epidemiológica mundial asegura la eficacia de los programas de vacunación. La Organización Mundial de la Salud (OMS) dedica cada año importantes recursos para sustentar la vigilancia mundial sobre cepas dominantes de gripe en los hemisferios norte y a partir del año 1999 en el hemisferio sur (Pontoriero y cols. 2003).

La eficacia de cualquier vacuna contra la gripe depende de cuan estrechamente relacionadas estén las cepas de la vacuna con las cepas en circulación. Debido a que los tipos principales de virus Influenza en circulación mundial incluyen un tipo A (H1N1), un A (H3N2) y un tipo B, las vacunas se formulan para incluir un subtipo de cada tipo con características antigénicas similares a las cepas prevalentes en circulación. La recomendación de la OMS para la vacuna de Influenza de los años 2011-2012 para el hemisferio Sur contiene dos cepas de Influenza A (H1N1pdm y H3N2) y una cepa de

Influenza B: A/California/7/2009 (H1N1)pdm09-like virus; A/Perth/16/2009 (H3N2)-like virus y B/Brisbane/60/2008-like virus (Información disponible en: <http://www.who.int/influenza/vaccines/recommendations/2012south/en/index.html>).

La vacunación anual puede ser el medio para reducir de forma eficiente y segura la morbi-mortalidad causada por los virus Influenza. Actualmente las vacunas presentan altas tasas de efectividad en niños y adultos (70 a 90%). Estudios realizados en Estados Unidos muestran que el grupo más delicado al virus de la Influenza, los adultos mayores, es el menos afectado por la vacuna, encontrándose una eficacia promedio aproximada 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).

Estudios realizados en Uruguay en referencia a la relación entre la vacuna y las cepas circulantes han evidenciado que:

- a) El virus de la Influenza B (VIB) que circuló en Uruguay durante el año 2002 estaba genética y antigénicamente poco relacionado con la cepa vacunal para ese año (Goñi y cols. 2007).
- b) Por otra parte estudios realizados para VIA subtipo H3 han demostrado de igual forma que las cepas vacunales se encontraban genéticamente en clúster diferentes a las cepas circulantes, salvo durante el año 2007 (Goñi y cols. 2009).
- c) Análisis de cepas de influenza A H1N1 pandémica (H1N1pdm) circulantes en Sudamérica en el año 2009 se agruparon en el clado 5, 6 y 7, mientras que la cepa vacunal pertenecía al clado 1 (Goñi y cols. 2011); los clados se definen por cambios aminoacídicos particulares (Nelson y cols. 2009).

Estos estudios nos demuestran claramente la necesidad de monitorear la variabilidad genética de las cepas que circulan en nuestro país y la región Sudamericana de forma de obtener vacunas más relacionadas y por lo tanto más efectivas.

2.1.2.2. Drogas Antivirales

A fin de controlar el desarrollo de la enfermedad se han diseñado dos tipos de drogas antivirales las cuales “van” contra dos proteínas fundamentales para la patogénesis viral (las cuales desarrollaremos más adelante) como son la proteína del canal iónico y la neuraminidasa. 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 actualmente en uso (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 ribonucleo proteínas virales (RNPv) al citoplasma (Wang y cols. 1993). Ambos poseen actividad antiviral contra VIA pero no contra VIB ni el Virus de la Influenza C (VIC) (Van Voris y Newell 1992). Si bien los adamantanos están asociados a varios efectos secundarios, han sido ampliamente usados por muchos años quizás debido a su amplia disponibilidad y bajo costo. Se ha observado un creciente aumento de la resistencia a este tipo de fármacos en los últimos años (Simonsen y cols. 2007). En la temporada 2005-2006 se observó un aumento de comunidades virales resistentes en Japón, sudeste asiático, Australia y norteamérica (Saito y cols. 2007; Barr y cols. 2007; Bright y cols. 2006). Los análisis filogenéticos han revelado que los virus resistentes provienen de un solo linaje que comparte una mutación en la posición aminoacídica 31 de la proteína M2 (S31N) la cual es el blanco de esta droga (Simonsen y cols. 2007, Hata y cols. 2007; Dawood y cols. 2009; Shinde y cols. 2009). Estos análisis han demostrado también que estos virus comparten cambios aminoacídicos característicos en las posiciones 193 (S193F) y 225 (D225N) de la proteína HA (Hata y cols 2007). Las mutaciones que confieren resistencia no comprometen la capacidad replicativa, la patogenicidad, ni la transmisibilidad viral (Bright y cols. 2005). Análisis de los VIA H1N1 pdm del año 2009 mostraron que los mismos fueron resistentes a la amantadina y rimantadina (OMS 2009c; Ramírez-Gonzales y cols. 2011).

La presión selectiva dirigida por drogas antivirales no siempre es responsable del surgimiento de una cepa resistente. Un ejemplo de esto es el VIA subtipo H3N2 que durante los últimos años ha aumentado a escala global el número de cepas resistentes a los adamantanos. Esta resistencia es causada por un simple cambio aminoacídico (Ser31Asn) en la posición 31 de la proteína M2. Extrañamente la frecuencia de la mutación Ser31Asn ha aumentado bruscamente 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. 2007a; Holmes 2009).

Por otro lado, los inhibidores de la neuraminidasa (INA) (Zanamivir y Oseltamivir) existen desde 1999. Estos mimetizan al sustrato de la neuraminidasa (NA) uniéndose al sitio activo y evitando de esta forma que esta clive los residuos de ácido siálico (Moscona, 2005) inhibiendo la liberación de los nuevos viriones (Liu y cols. 1995; Palese y Shaw 2007), limitando de esta forma la infección. Los INA si bien son más costosos, tienen menos efectos secundarios adversos respecto a los inhibidores del canal iónico y han generado al momento menos cepas resistentes. Estos se utilizan de forma profiláctica y terapéutica tanto para VIA y VIB (McKimm-Breschkin 2005; Wright y cols. 2007).

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, es necesario el desarrollo de nuevos antivirales 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.

2.2. El virus de Influenza

2.2.1. Clasificación y Nomenclatura

Los virus Influenza pertenecen a la familia *Orthomyxoviridae*. Esta familia se encuentra compuesta por cinco géneros diferentes: virus Influenza A (VIA), virus Influenza B (VIB), virus Influenza C (VIC), virus Thogoto y los Isavirus (Palese y Shaw. 2007). Los Virus Influenza son clasificados en tres tipos (A, B y C) de acuerdo a la reactividad antigénica de las proteínas de matriz y no estructural del virión, siendo los tipos A y B los principalmente implicados en enfermedades severas en humanos (Slemons y cols. 1974).

En lo que refiere al virus de influenza A existen identificados y bien caracterizados múltiples subtipos generados, a través de combinaciones de los dieciséis genes que codifican para la glicoproteína 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 regularmente (Webster y cols. 1992). Por otra parte los virus de tipo B, son mucho más uniformes, ya que portan una sola variante de hemaglutinina y otra de neuraminidasa, si bien la secuencia de aminoácidos (aa) también varía de una cepa B a otra (Laver y cols. 1999). Actualmente se ha documentado la existencia de un reservorio de Influenza A en murciélagos de América Central, lo que constituye un potencial reservorio de Influenza en mamíferos salvajes. Este virus es significativamente divergente de entre los virus de Influenza A conocidos. Se estimó que la Hemaglutinina del virus de murcielago ha ido divergiendo al mismo tiempo que los subtipos conocidos de HA, designándolo H17. Asimismo, el gen de la NA de este nuevo virus es el más divergente de todos los subtipos de NA conocidos, designándolo N10 (Tong y cols. 2012).

La denominación taxonómica de los virus de la influenza es a través de 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,

denominación de la cepa y año de aislamiento seguido entre paréntesis de la descripción antigénica del subtipo de HA y NA (Figura 1).

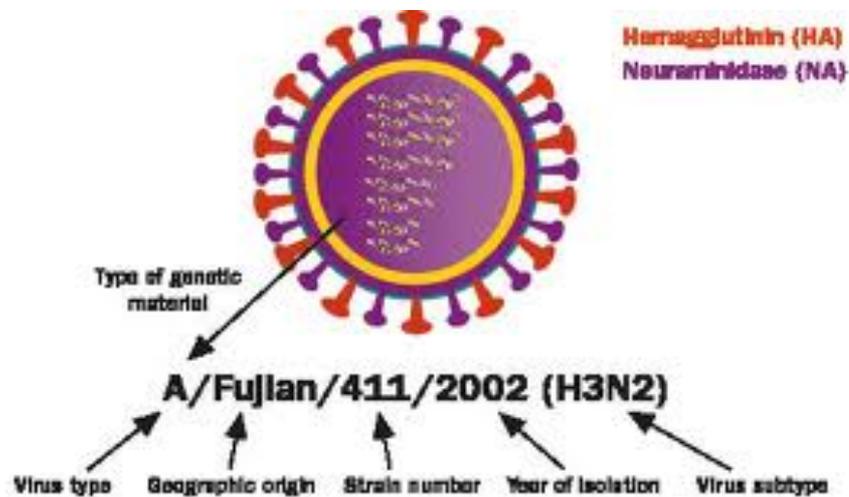


Figura1. Nomenclatura de los virus de la Influenza A en humanos.

Extraído de <http://www.mayomedicallaboratodies.com/articles/communique/2009/11.html>.

2.2.2. Morfología y Estructura del Virión

Los virus de influenza se caracterizan por ser virus envueltos cuyo genoma está constituido por ARN de cadena simple de polaridad negativa segmentado (los tipos A y B contiene ocho segmentos) (Neumann y cols. 2004).

Los viriones de los VIA presentan un estructura pleiomórfica, encontrándose estructuras esféricas de aproximadamente 100 nanómetros (nm) de diámetro así como también viriones filamentosos de 100nm de diámetro y más de 20nm de largo (Rossman y Lamb. 2011).

La superficie más externa del virus está constituida por una envoltura lipídica adquirida de la membrana plasmática de la célula hospedera en la etapa de brotamiento. Más internamente en el virión, por debajo de dicha envoltura, se encuentra la proteína de la matriz (M); la morfología de los viriones parece estar determinada por esta proteína, aunque la HA y la Nucleoproteína (NP) también contribuyen (Kawaoka 2001). Observaciones al microscopio electrónico muestran la

bicapa lipídica rodeada por espículas o proyecciones que corresponden a las dos glicoproteínas de superficie y mayoritarias en el virión: 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). Los estados de agregación de las proteínas de superficie son diversos, la HA se encuentra formando homotrímeros mientras que NA y M2 forman homotetrámeros.

El genoma de VIA codifica once proteínas, sin embargo solo HA y NA son sometidas a N-glicosilación, no observándose O-glicosilación (Zhirnov y cols. 2009; Blake y cols. 2009), por tanto contienen exclusivamente azúcares del tipo N-glicosídico (Gamblin y cols. 2010). Esta generalmente aceptado que la respuesta inmune del hospedero esta principalmente enfocada a las proteínas HA y NA, por lo que ambas actividades son blanco de anticuerpos específicos que reaccionan frente a ellas previniendo la infección. Debido a la presión inmune ejercida por estos anticuerpos, las propiedades antigénicas de estas glicoproteínas virales varían a lo largo del tiempo. De esta forma los virus de la gripe pueden cambiar su antigenicidad y evadir así los mecanismos inmunológicos de su hospedero (Gamblin y Skehel 2010).

Los tres polipéptidos de la envoltura antes mencionados, HA, NA y M2, son proteínas integrales de membrana y presentan 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. Debajo de la envoltura viral se encuentra la proteína de matriz (M1), esta le brinda estructura al virión y establece interacciones entre la membrana lipídica y el core interno de RNPv. El core interno consiste en los ocho segmentos de ARN viral (ARNv) asociados a 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 ácida (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).

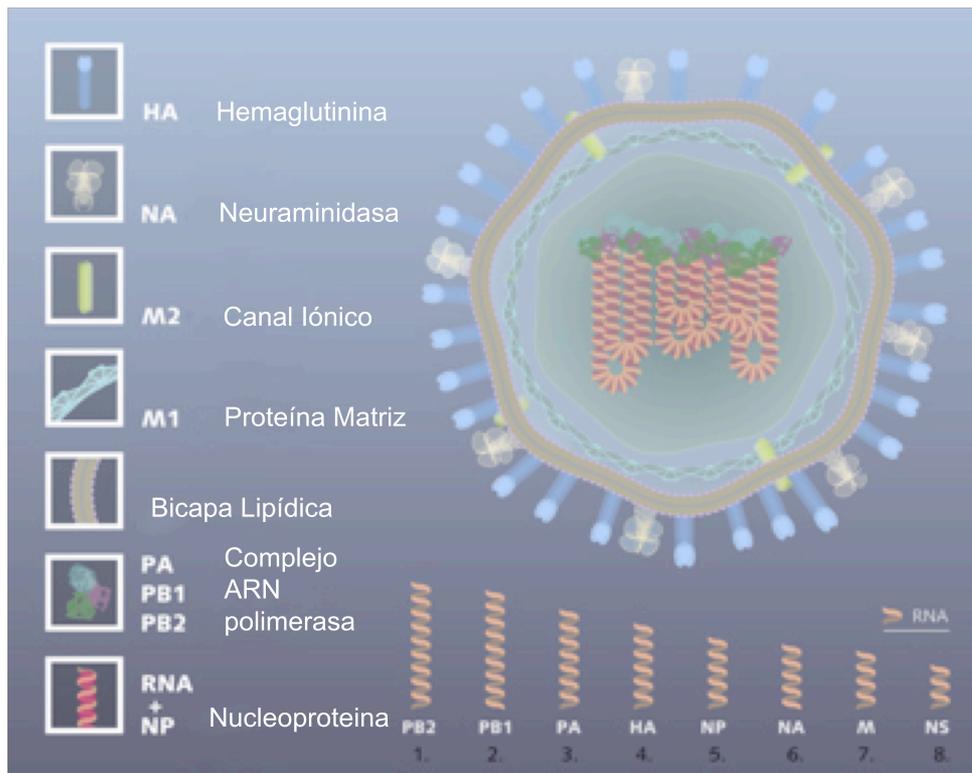


Figura 2. Diagrama esquemático de la estructura de VIA. Se observan proteínas integrales de membrana (HA, NA y M2). Por debajo se aprecia la proteína (M1). Los ocho segmentos genómicos de ARN se encuentran rodeados de las nucleoproteínas (NP) y asociados al complejo de ARN polimerasa viral (PB1, PB2 y PA). Se puede observar la presencia de la proteína no estructural (NEP/NS2). Adaptado de Alice Carolyn McHardy y Ben Adams Plos Pathogens.

2.2.3. Organización del Genoma y sus proteínas codificantes

Los virus de la Influenza se caracterizan por presentar un genoma ARN simple cadena segmentado de polaridad negativa. Los VIA y VIB poseen ocho segmentos de ARN, mientras que los VIC presentan únicamente siete (Palese y Shaw. 2007).

El genoma completo de los VIA consta de 13.600 nucleótidos (nt) (Kawaoka 2001). Su genoma está constituido por ocho segmentos que codifican once polipéptidos (Palese y Shaw. 2007; Taubenberger y Kash. 2010). Los genes virales en su mayoría codifican para una única proteína, a excepción de los segmentos génicos M y NS que codifican para dos cada uno (Kawaoka 2001) (Figura 3). Todos los segmentos génicos de VIA presentan características altamente conservadas en sus extremos. Los primeros doce

nucleótidos en el extremo 3' y los últimos trece en el extremo 5' son parcialmente complementarios y se encuentran asociados entre sí y con el complejo de la polimerasa. Diversos modelos estructurales se han propuesto para las regiones de interacción entre ambos extremos (Robertson 1979).

Cuando el virus infecta una célula susceptible y permisiva encontramos dentro de ésta tres tipos de ARN de origen viral:

a) Por un lado, los ARN mensajeros (ARNm), producto de la transcripción del genoma viral. Estos poseen polaridad positiva, contienen en el extremo 5' una estructura de cap (7 metil-guanosina, nucleótido modificado de guanina) que le "roba" a los ARNm celulares y 10 a 13 nucleótidos de origen no viral; y en el extremo 3' poseen una cola Poly A.

b) Por otro lado están los ARNv, que tienen polaridad negativa, son el producto del proceso de replicación, son los ARN genómicos que se encapsidaran en los viriones de la progenie.

c) Finalmente están los ARN copia (ARNc), que son copia complementaria de los ARNv, aunque no poseen cap ni cola Poly A y se encuentran localizados en forma acumulada en el núcleo de la célula infectada, actuando como molde para la síntesis de los nuevos ARNv (Nayak 1994; Biswas y cols. 1998; Kawaoka 2001).

Los distintos segmentos del genoma de VIA codifican diferentes tipos de proteínas con funciones específicas. Básicamente, las mismas son clasificadas en dos tipos: proteínas estructurales y proteínas no estructurales. Las proteínas estructurales son nueve y están presentes en la partícula viral completa propiamente dicha. Dentro de este grupo de proteínas encontramos a HA, NA, M, M2, NP y un complejo multiproteico formado por las proteínas PA, PB1 y PB2. Por otra parte las proteínas no estructurales, están presentes únicamente en la célula infectada y pueden encontrarse en el núcleo como NS1 o en el núcleo y el citoplasma como NS2. Presenta función específica sobre el ARN celular, dirigiendo el proceso de síntesis de proteínas virales (ver Figura 3 y Tabla 1).

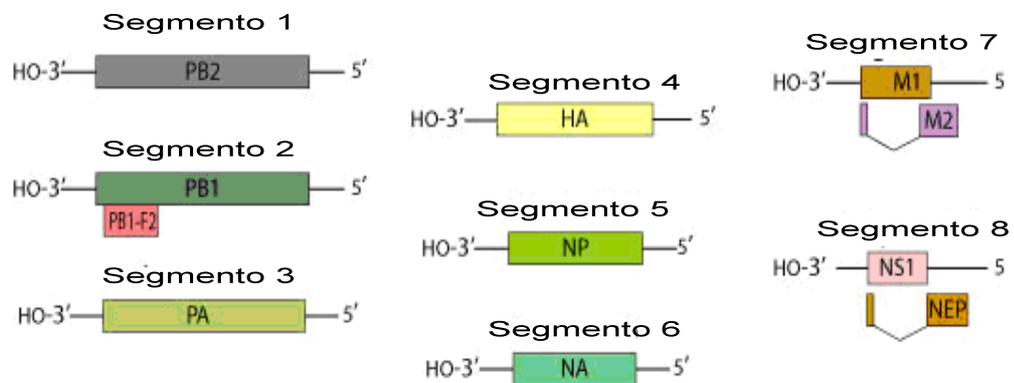


Figura 3. Organización genómica de VIA. Se muestran los 8 segmentos genéticos de polaridad negativa los cuales codifican para once proteínas virales (PB2, PB1, PB1-F2, PA, HA, NP, NA, M1, M2, NS1 y NS2). Si bien la mayoría de los segmentos genéticos codifica una proteína, los segmentos 7 y 8 dan lugar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

Tabla 1. Segmentos génicos y proteínas codificadas por el virus Influenza A. En la tabla se puede observar el tamaño en nt de cada segmento génico del genoma de Influenza A H3N2, el nombre de cada uno de las proteínas codificadas por éstos, el tamaño en aminoácidos, y su función.

Gen	Longitud nt	Proteína	Tamaño aa	Función
1	2341	PB2	759	Transcriptasa
2	2341	PB1	757	Trasncryptasa. 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 al 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	252	M1 Proteína de matriz, componente principal del virión. Interacción entre RNPv y envoltura viral.
		M2	96	M2 proteína integral de membrana. Canal iónico en la penetración viral.
8	890	NS1	230	NS1 proteína no estructural. Sólo en núcleo de células infectadas. Efecto sobre el transporte, división y traducción de ARN celular.
		NS2	121	Antagonista del INF. NS2 proteína no estructural. Núcleo y citoplasma celular. Transporte de nucleocapside hacia la membrana citoplasmática junto a M1.

2.2.3.1. Polimerasas

El complejo multiproteico polimerasa es un heterotrimerico constituido por las subunidades PB1, PB2 y PA de 250 KDa, responsable de la replicación y transcripción del ARNv (Kawaoka 2001; Resa-Infante 2011). La subunidad PB2 es una proteina de 759 aminoácidos (aa) codificada por el segmento 1 de ARNv de 2341nt. Dicha proteina desempeña un rol fundamental en la iniciación de la transcripción debido a su unión al cap en las moléculas pre-ARNm del hospedero. Es necesaria para la iniciación de la transcripción viral, pero no para la síntesis del genoma de polaridad negativa ni el antígeno de polaridad positiva los cuales no poseen 5'cap ni 3' cola poly A (Palese y Shaw 2007; Resa-Infante 2011).

El segmento 2 del ARNv de 2341nt codifica la subunidad PB1 constituida por 757aa. Comprende el núcleo del complejo e interacciona a través del extremo N-terminal con PA y a través del extremo C-terminal con PB2 (Digard y cols. 1996; Resa-Infante 2011). Evolutivamente, PB1 es la subunidad más conservada y posee varios motivos de secuencias características de ARN polimerasa ARN dependiente (Poch y cols. 1989), orquestando la iniciación y elongación del nuevo ARN sintetizado. Se ha descrito la proteina PB1-F2, codificada por un marco de lectura alternativo del segmento 2 del ARNv. Su rol principal en la virulencia estaría involucrado en la inducción de apoptosis en células del sistema inmune, haciendo menos eficaz la eliminación del virus (Chen y cols. 2001). Para la iniciación de la transcripción y replicación, PB1 es también responsable de la unión a los extremos terminales tanto del ARNv (Gonzalez y Ortin 1999; Li y cols. 1998) como del ARNc (Gonzalez y Ortin 1999). PB1 presenta actividad endonucleasa, la cual es activada mediante la interacción con el extremo 3' del ARNv, dicha actividad genera los oligonucleótidos capeados necesarios para la síntesis del ARNm.

Finalmente, la tercer subunidad del complejo polimerasa es la PA compuesta por 716 aa, codificada por el segmento 3 de ARNv de 2233nt. Esta proteina es una fosfoproteina que presenta actividad proteasa implicada en la replicación del ARNv. Dicha subunidad impulsa 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 dicho proceso. La ARN polimerasa está asociada con las nucleoproteinas y al ARNv formando las denominadas RNPv uniéndose

específicamente a secuencias conservadas en los extremo 5' y 3' presentes en los ocho segmentos de ARNV (Fodor y cols. 1994; Perales y cols. 2000).

2.2.3.2. Hemaglutinina

El segmento 4 del ARNV de 1770 nt de longitud codifica la Hemaglutinina (HA), una glicoproteína integral de membrana de tipo I de 566aa. Su nombre es debido a la capacidad que presenta dicha proteína 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. En el proceso de infección viral la HA desempeña dos funciones esenciales. Por un lado es la responsable de la unión al receptor (ácido siálico) en las cadenas de carbohidratos de las glicoproteínas o glicolípidos en la superficie de las células susceptibles. Por otra parte juega un papel importante en la fusión de la 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, donde cada subunidad 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 hospedero en residuos conservados de arginina en dos subunidades, generando HA1 y HA2 ambas unidas por un enlace disulfuro. Para que el virus sea infeccioso y pueda cumplir un nuevo ciclo replicativo, HA0 debe ser clivado ya que es necesario para activar la fusión de la envoltura viral y la membrana endosomal (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 blancos antigénicos 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 región HA1 de la proteína es donde se concentra la mayor parte de los epítopes, siendo esta la principal responsable de la antigenicidad. La HA presenta cinco epítopes variables (A, B, C, D y E), distribuidos principalmente en la superficie de la proteína cada uno con aproximadamente veinte

aminoácidos. 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). Dado las dimensiones y disposición conformacional, este hueco es inaccesible a la unión por anticuerpos, pero las regiones adyacentes están muy expuestas y constituyen las zonas inmunodominantes en la respuesta humoral del hospedero. La región HA2 contiene la cola citoplasmática y la región hidrofóbica que permite el anclaje de la HA en la membrana. Una vez en la vía endocítica, 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 de la proteína HA2, altamente hidrofóbico, ejerza su función de fusión de membrana, permitiendo la entrada del virus a la célula. (Garten y Klenk 1999).

2.2.3.3. Nucleoproteína

El segmento genómico 5 del ARNv de 1565nt de longitud codifica para la Nucleoproteína (NP). NP es una importante fosfoproteína estructural de 498 aa y presenta múltiples funciones en el ciclo infeccioso del virus. La misma es una proteína básica, rica en arginina, glicina y serina con carga neta positiva a pH neutro, dichas condiciones fisicoquímicas facilitan la interacción con el ARN cargado negativamente (Biswas y cols. 1998; Palese y Shaw 2007). Por lo antedicho es que la NP presenta una considerable afinidad de interacción por el ARNv, la cual es independiente 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). Por otra parte, además de dichas 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).

2.2.3.4. Neuraminidasa

El segmento 6 de ARNv de 1413nt codifica la proteína Neuraminidasa (NA), una glicoproteína integral de membrana de tipo II de 470 aa. Esta se ensambla formando tetrámeros a partir de subunidades idénticas. Presenta 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, presentando aminoácidos conservados entre las distintas cepas virales, que corresponde al sitio activo de la enzima. 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 enzimática sialidasa, requerida para el clivaje tanto del ácido siálico sobre la célula del hospedero promoviendo la liberación de las nuevas partículas virales, como del ácido Siálico sobre las glicoproteínas virales, previniendo de esta forma la agregación de las partículas virales nacientes (Jeffery, 2010). 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).

2.2.3.5. Matriz

El segmento génico 7 del ARNv de 1027nt de longitud codifica para la proteína Matriz (M1) de 252 aa, la proteína mas conservada del virus. Esta proteína se localiza por debajo de la membrana plasmática proporcionando la estructura a la partícula viral y constituye la proteína más abundante del virión. La proteína M1 contiene tres dominios bundled α -helice separados por una corta secuencia de unión, con el dominio medio mediando la oligomerización y asociación con la RNP. Una de las superficies de la misma está fuertemente cargada positivamente (Sha y Luo 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 documentado que una importante modificación post-traducciona (SUMOylation, por sus siglas en inglés **S**mall **U**biquitin-like **M**odifier) 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 y ARN virales se acumulan en la célula, además esto es requerido 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 intrón de 689 nt. M2 es una proteína integral de membrana tipo III que se asocia en la membrana como un homotetramero. 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). Recientemente se ha documentado que la cola citoplasmática de M2 y específicamente su hélice con residuos anfipáticos podrían jugar un rol preponderante en el ensamblaje y brotamiento del virus (Chen y cols. 2008; Iwatsuki-Horimoto y cols. 2006; McCown y Prekosz, 2005; McCown y Prekosz, 2006; Rossman J y Lamb R, 2011). Se expresa de forma abundante en la membrana plasmática de las células infectadas, junto con la HA y NA, sin embargo, está poco expresada en la superficie del virón (Lamb y cols. 1985). La forma biológicamente activa de la proteína es un tetramero 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.

2.2.3.6. Proteínas no estructurales

La proteína NS1 y NS2, como su nombre lo indica, son proteínas no estructurales y están codificadas por el segmento génico 8 del ARNv de 890 nt. La primera de ellas a partir del transcripto primario y la segunda a partir del transcrito procesado, dando lugar a proteínas de 230 y 121 aa respectivamente (Palese y Shaw. 2007).

NS1 posee dos dominios funcionales; el N-terminal de unión al ARNv y el C-terminal efector, el cual media interacciones con proteínas de la célula hospedera y estabiliza el dominio de unión al ARNv. Ésta proteína se encuentra formando homodímeros y la dimerización es importante para la unión al ARNv (Hale y cols. 2008). Inhibe tanto el “corte y empalme” (en inglés “splicing”) de los pre-ARNm como la exportación nuclear de los ARNm celulares, facilitando la traducción de los ARNm virales. Ambos dominios de la proteína, el de unión al ARN y el efector son requeridos para dichas funciones (Li y cols. 1998). Presenta una expresión diferencial espacio-temporal, localizándose en el núcleo en estadios tempranos de la infección viral (Portela y cols. 1985), mientras que a tiempos posteriores se localiza en citoplasma celular asociándose a polisomas (Falcon y cols. 1999). La proteína NS1 también presenta relación en la inhibición de la respuesta inmunitaria del hospedero, principalmente en la limitación de la producción del interferón (INF) (Jia y cols. 2010). A nivel celular la NS1 también cumple un rol importante en la inhibición de la activación de células dendríticas, facilitando al virus establecer una infección (Fernández Sesma. 2007). La proteína NS2 presenta una señal de exportación nuclear (“NES”, por sus siglas en inglés “Nuclear Export Signal”) y se une con M1 (Shimizu y cols. 2010). Se asocia con las RNPv a través de la interacción con la región C-terminal de la proteína M1. Presenta 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.

2.2.4. Ciclo Replicativo de VIA

2.2.4.1. Adsorción y Penetración

En toda infección, el agente patógeno debe presentar tropismo por la célula blanco, el cual viene dado principalmente por la interacción específica entre el receptor celular y proteínas virales de unión a dicho receptor. Por tanto, el primer paso en la multiplicación viral es la unión del virus al receptor en la célula susceptible. La afinidad de la HA por los residuos de ácido siálico presentes sobre los receptores celulares depende de la naturaleza de su enlace al sacárido en la glicoproteína. Los virus de aves y equinos se unen preferentemente a receptores que contienen a la galactosa unida por enlaces α (2,3), mientras los virus humanos se unen a receptores con terminaciones α (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 descenso del pH dentro de la vesícula endocítica causa un cambio conformacional de la HA (previamente clivada), promoviendo 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). La baja en el pH endosomal activa también el flujo de protones desde el endosoma al interior de la partícula, a través de la proteína M2. La activación de M2 induce el descenso del pH en el interior de la partícula viral permitiendo la desestabilización de las interacciones entre las RNPv y la M1 (Lamb 1994). Dicha desestabilización es necesaria para la infección ya que la proteína M1 inhibe la entrada de la RNPv al núcleo por enmascarar la señal de localización nuclear (Bui y cols. 1996).

Estos virus particularmente, a diferencia de la mayoría de los virus ARN, transcriben y replican en el núcleo ya que necesitan los 5'cap de los pre-ARNm celulares y la maquinaria de "splicing". Posterior a la penetración, los complejos de RNPv migran hacia el núcleo y entran por transporte activo. NP, PB1, PB2 y PA presentan 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).

2.2.4.2. Transcripción y Traducción

En el proceso de transcripción las moléculas 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 tramo de oligo U en el molde de ARNv (Robertson y cols. 1981), generando los ARNm que darán origen a las proteínas virales.

En su gran mayoría los ARNm son traducidos por ribosomas libres en el citoplasma, siendo los ARNm de M y NS procesados por "splicing" previo a su salida del núcleo. Por otro lado, los ARNm de HA, NA y M2 son traducidos por ribosomas unidos al retículo endoplasmático, pasando 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).

2.2.4.3. Replicación

El proceso de 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 la adición de la cola poly A en el extremo 3'. La replicación ocurre en dos pasos, primero se sintetiza ARNc de polaridad positiva y luego este intermediario replicativo sirve como molde para la síntesis del 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 tramo 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).

2.2.4.4. Ensamblaje y Brotamiento

Luego de los eventos replicativos los nuevos complejos de RNPv se ensamblan en el núcleo para exportarse al citoplasma. En primer lugar las proteínas PA, PB1, PB2 y NP son enviados al núcleo para formar las nuevas RNPv junto al ARNv recién sintetizado. Luego de su síntesis en el citosol, la entrada al núcleo de las proteínas 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). Durante el ensamblaje, HA, NA, y M2 se dirigen en forma coordinada a la región apical de la membrana plasmática, 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 (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 de la célula hospedera. 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 dichos componentes (Laver y cols. 1999; Palese y Shaw 2007; Rossman y Lamb 2011), (ver Figura 4).

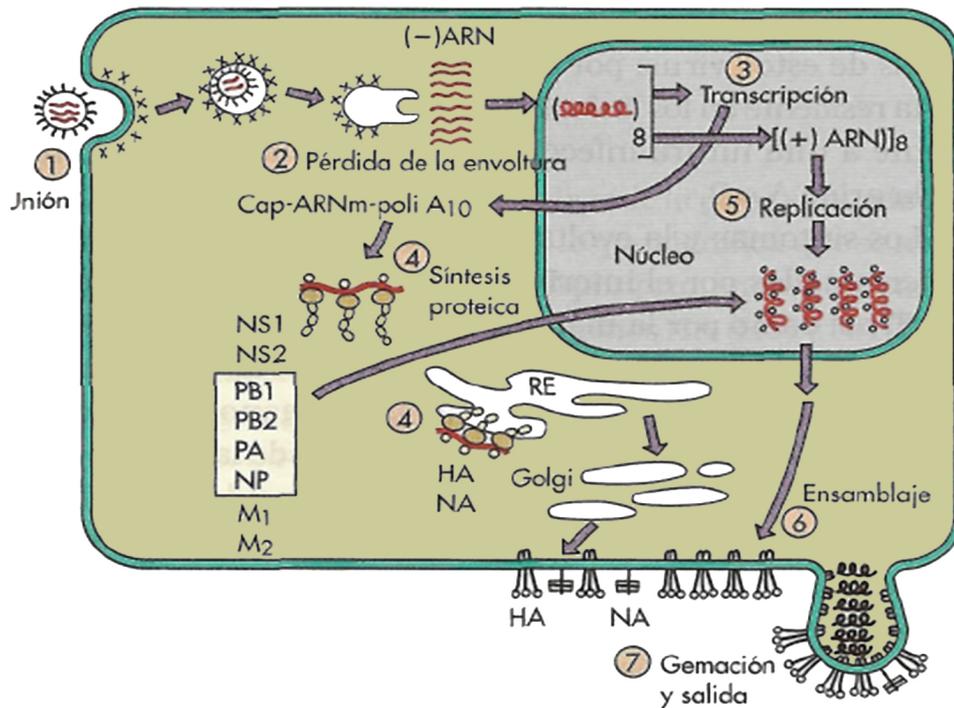


Figura 4. Diagrama del ciclo replicativo de VIA. Una vez unido a la superficie celular el virus es internalizado por endocitosis mediada por receptor. El endosoma acidificado desencadena la fusión de la membrana endosomal y viral, liberando las RNPv al citoplasma. Estas últimas son transportadas al núcleo 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. Adaptado de <http://virologiamedicafesc.blogspot.com/2010/10/virus-influenza.html>

2.3. Mecanismos de Variabilidad Genética

El alto grado de variabilidad genética que presentan los VIA es debido a varios factores, entre los que encontramos su alta tasa de replicación, la alta tasa de error de la ARN polimerasa ARN dependiente, la falta de actividad correctora de errores de esta enzima y al proceso de reordenamiento génico (Duffy y cols. 2008). Existe también una fuerte presión selectiva al 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 es generada en Influenza A por dos procesos fundamentales:

1) La deriva antigénica. Este es el proceso que resulta de la fijación selectiva de mutaciones principalmente en el gen que codifica para la HA, el principal blanco de la respuesta inmune del hospedero. Las variantes que mejor escapan a la respuesta inmune del hospedero son las que tienen ventajas replicativas significativas (Hillerman 2002; De Jong y cols. 2000). La deriva antigénica ocurre frecuentemente en los VIA y VIB, de hecho en VIB la principal vía de modificación es la deriva antigénica.

2) El salto antigénico, es considerado la mayor fuerza evolutiva en la evolución de VIA y se ha observado también en VIB entre cepas co-circulantes de diferentes linajes (Chi y cols. 2002; Shaw y cols. 2002). Una de las ventajas principales que le brinda a los virus de la Influenza la segmentación del genoma, es la alta probabilidad de sufrir reordenamientos genéticos lo cual contribuyen a la gran variabilidad inmunológica, particularmente en los antígenos HA y NA de los virus del tipo A (Hillerman 2002; De Jong y cols. 2000). El salto antigénico ocurre cuando el virus adquiere una HA perteneciente a un subtipo de VIA diferente, mediante el proceso denominado rearreglo génico. 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 o ninguna inmunidad (Ferguson y cols. 2003) (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 aviares o suinos (Taubenberger y cols. 2006).

En general los virus de Influenza A se consideran hospedero específico, sin embargo se ha visto que algunos logran traspasar la barrera entre especies (Yassine y cols. 2007). Esto se conoce como salto interespecie, como son los casos de H5N1 y H7N7, y más recientemente lo sucedido en abril del 2013 con H7N9 (Uyeki y cols. 2013) .

No debemos olvidar que la recombinación es otro mecanismo importante para la generación de diversidad en los virus. En Influenza 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. Este único reporte realizado hasta el momento nos hace presumir que este mecanismo sea poco frecuente entre virus de la Influenza (Olrich y cols. 1994).

Los virus ARN se replican con una elevada tasa de error, debido a la ausencia de actividad correctora de errores de su ARN polimerasa, y se organizan en poblaciones de muy alta diversidad genética denominadas cuasiespecies, es decir como una nube de mutantes fuertemente relacionadas genéticamente (Domingo, 2002; Wang et al., 2002). Estas características les confieren a los virus de ARN una gran capacidad de adaptación a los cambios en las presiones selectivas. El entendimiento de la dinámica evolutiva de los virus de la influenza A es de gran importancia para su control y vigilancia. Aparentemente la deriva antigénica parece ser un proceso más esporádico de lo que se creía, lo que condujo a cuestionarse cuándo ocurre este proceso: probablemente durante los conocidos “cuellos de botella” que ocurren en forma local dentro de una población, principalmente coincidiendo con los saltos antigénicos, o simplemente bajo ciertas condiciones epidemiológicas en particular (Nelson y cols, 2006) (figura 5).

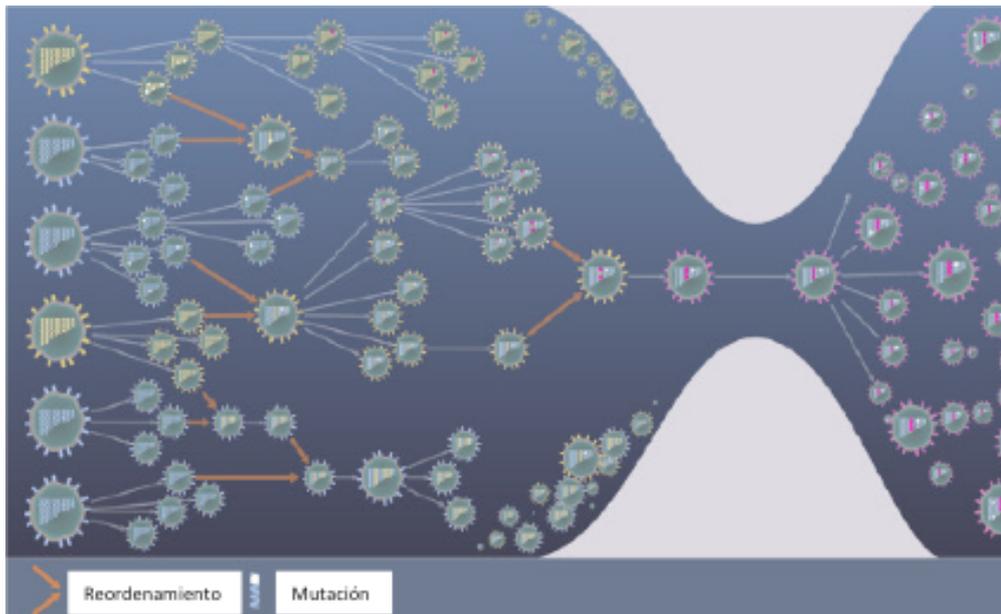


Figura 5. Generación de diversidad genética y deriva antigénica en la evolución de los virus de la influenza A humana. Virus azules y amarillos representan dos cepas antigénicamente similares del mismo subtipo que circula en la población humana. La diversidad genética de la población viral circulante aumenta a través de la mutación y el reordenamiento. Simples flechas blancas indican las relaciones entre los virus ancestrales y descendientes. Marcas blancas en los segmentos indican las mutaciones neutrales y marcas rojas indican las mutaciones que afectan a las regiones antigénicas de las proteínas de superficie. Pares de entradas de flechas de color naranja indican la generación de reordenantes con segmentos de dos virus diferentes ancestrales. Como estos virus continúan circulando, la inmunidad contra ellos aumenta en la población anfitriona, representada aquí por el estrechamiento del cuello de botella. En paralelo, los virus con mutaciones que afectan a las regiones antigénicas de las proteínas de superficie se acumulan en la población viral. En algún momento una nueva variante antigénica se genera, indicado por un virus de color rojo, que es menos afectado por la inmunidad en la población humana. Esta variante es capaz de causar infección generalizada y funda un nuevo grupo de cepas antigénicamente similares. Adaptado de Alice Carolyn McHardy y Ben Adams Plos Pathogens.

Los integrantes pertenecientes a los diferentes géneros de la Familia *Orthomyxoviridae* presentan reordenamiento genético, posibilitando el intercambio de la información genética. Sin embargo, nunca ha sido identificado un reordenamiento entre miembros de diferentes géneros, siendo esto una manifestación de la especiación como resultado de la divergencia evolutiva (Palese y Shaw 2007).

La evolución de los virus de la Influenza también está caracterizada por presentar altas tasas de sustituciones aminoacídicas en las proteínas HA y NA. Gran cantidad de estudios experimentales y análisis estadísticos de datos genéticos y antigénicos han

identificado diversos grupos de residuos en la HA y NA, (epítopes), que se unen a los anticuerpos humanos (Laver y cols. 1982). Debido a esto, los epítopes tienden a evolucionar más rápidamente, evadiendo la inmunidad dada su intrínseca relación con la presión ejercida por el sistema inmune. De hecho, numerosos estudios recientes muestran una serie de aminoácidos en sitios específicos de la HA que evolucionaron bajo una selección positiva durante los últimos 40 años (Blackburne y cols. 2008). En suma al escape de los anticuerpos humanos, otras fuerzas selectivas actúan en la HA. Dado su actividad funcional, la HA debe mantener su estabilidad y función, por tal motivo las mutaciones que escapen a los anticuerpos no deben involucrar esas propiedades de la proteína. Gran cantidad de estudios relacionados a la evolución de proteínas in vitro así como también estudios en bacterias y virus han desenmascarado que muchas de las mutaciones “beneficiosas” son frecuentemente pleiotrópicas, es decir, además de su efecto beneficioso original, causan usualmente efectos secundarios negativos en otras propiedades de la proteína, tales como la estabilidad (Bloom y cols. 2009). Tales efectos negativos pueden ser enmascarados o compensados por otras mutaciones, haciendo que determinada combinación de mutaciones sean más favorable que una única mutación por separado (SanJuan y cols. 2005). Dicho fenómeno es conocido como epístasis positiva entre mutaciones (De Visser y cols. 2007). Por otro lado, si la combinación de mutaciones muestra una baja capacidad replicativa respecto a lo esperado cuando ocurren mutaciones de forma individual, la epístasis es considerada negativa (De Visser y cols. 2007).

2.4. Epidemiología del virus de Influenza A

En contraste a los VIB y VIC que presentan sesgo mayormente por el hospedero humano, los VIA presentan un espectro más amplio involucrando distintas especies de hospederos (Wright y cols. 2007). Los VIA están ampliamente distribuidos en la naturaleza, infectan una gran variedad de especies de animales, tanto aviares como mamíferos, siendo las aves acuáticas su reservorio natural (Webster y cols. 1992; Taubenberger y cols. 2010). En su mayoría, las aves acuáticas migratorias son infectadas de forma asintomática por VIA, multiplicándose éste en las células de su epitelio intestinal y eliminándose por las heces en cantidades abundantes (Wright y

cols. 2007). Dicho mecanismo de transmisión oral-fecal es totalmente distinto a las transmisiones inter-humanas 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 por 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 pasaje por los hospederos intermediarios favorece 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 son susceptibles a 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 demostrado, 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 "mezclador" 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.

A diferencia de la mayoría de los patógenos, donde la exposición lleva a una inmunidad duradera en el hospedero, VIA presenta una blanco antigénico variable, evadiendo de esta forma la inmunidad específica disparada por infecciones previas (Wolf y cols. 2006). Esto conlleva a una de las más importantes características en la epidemiología de los VIA que es su capacidad de producir epidemias anuales. Debido al proceso de deriva antigénica las epidemias anuales están relacionadas fuertemente a la disminución de la inmunidad frente a los sitios antigénicos en la superficie de las glicoproteínas HA y NA. Cada año las nuevas variantes desplazan a las variantes más viejas (Boni 2008; McHardy y Adams 2009). La morbilidad y mortalidad por infecciones del tracto respiratorio son afectadas por las variantes antigénicas emergentes. Prácticamente cada año ocurren las epidemias, pero varían en intensidad. Durante periodos más fríos del año en las zonas de clima templado, causan considerable morbilidad en todos los grupos etarios (OMS 2009a).

Por otra parte nuevas pandemias de VIA pueden emerger a través del rearrreglo con cepas de este virus presentes en reservorios aviáres o porcinos (Kilbourne y cols. 2002). Estas ocurren cuando hay un contacto frecuente entre humanos y ciertas especies de animales que pueden ser infectados con virus de Influenza propios y cuando estos virus desarrollan la habilidad de traspasar la barrera de la especie para infectar humanos. La habilidad de traspasar esta barrera se hace posible en la presencia de ciertas mutaciones o rearrreglos que permiten la unión específica de estos virus a las proteínas de superficie en las células del epitelio respiratorio humano (Yamada y cols. 2006). Las pandemias se caracterizan por su ocurrencia a intervalos impredecibles, presencia de brotes en todo el mundo, aparición como consecuencia de reordenamientos génicos y transmisión ínter-especie, donde un nuevo subtipo de virus de la Influenza aparece y ante el cual la población mundial posee poca o ninguna inmunidad. Son generalmente graves cuando existen cambios significativos en los principales antígenos de superficie del virus. Este proceso es el causante de las más devastantes pandemias de influenza que han ocurrido en varias ocasiones en el siglo pasado (Ferguson y cols. 2003). Han existido importantes pandemias en los últimos 100 años: la pandemia de 1918 (subtipo H1N1) (Smith y cols. 2009), la pandemia de 1957 (subtipo H2N2) (Scholtissek y cols. 1978), la pandemia de 1968 (subtipo H3N2) (Kawaoka y cols. 1989). Recientemente, en abril del año 2009, emergió un nuevo virus subtipo H1N1 pandémico (H1N1pdm) y con él la primera pandemia del siglo XXI (Neumann y cols. 2009; Garten y cols. 2009). Durante cada una de estas pandemias, los nuevos virus reemplazaron a los de la pandemia anterior de circulación (Wolf y cols. 2006). En la actualidad los subtipos H3N2 y H1N1 continúan circulando mayoritariamente en el hombre (Neumann y cols. 2009). Muchos de estos brotes parecen haber comenzado en Asia, más probablemente en China (Patterson 1986). Dado la importante interacción y cercanía entre los humanos y animales domésticos, esta región ha sido considerada 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 debe ser estudiada 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).

2.5. Virus de la Influenza A subtipo H3N2

Durante el año 1968 emergió un nuevo virus humano subtipo H3N2 pandémico causante de la llamada gripe de Hong Kong. En sus fases iniciales, la pandemia se extendió a los países vecinos, asimismo fue considerada poco severa. El virus fue generado por reordenamiento génico entre un virus humano H2N2 y uno de origen aviar H3N2, introduciendo a la población humana la H3 y PB1 de origen aviar (Taubenberger y Kash 2010). Desde ese entonces el subtipo H3N2 ha estado circulando, causando morbilidad y mortalidad en sucesivas epidemias. A diferencia de los virus A/H1N1, los virus A/H3N2 evolucionan más rápidamente (Rambaut y cols. 2008) y son el subtipo más dominante seguido luego por los virus de la influenza B y luego A/H1N1 (Finkelman y cols. 2007).

Los eventos de reordenamiento de genes intra-subtipo son un factor importante en la evolución a largo plazo de los VIA, debido a que los múltiples segmentos involucrados juegan un rol importante en la generación de cepas epidémicas. Este fenómeno ha sido demostrado también en virus de la influenza A H3N2 (Holmes y cols. 2005).

Análisis de secuencias de virus de la influenza A de origen humano, sugieren que han evolucionado a partir de un linaje único (Yamashita y cols. 1988). Sin embargo, diferentes sublinajes de virus Influenza A H3N2 pueden co-circular en humanos durante periodos cortos. Mediante ensayos de inhibición de la hemaglutinación (IHA) se han identificado dos grupos diferentes de variantes antigénicas de Influenza A/H3N2 (CDC, 1991). Estos grupos estaban representados por las cepas A/Beijing/353/89 y A/Shanghai/24/90. Virus similares co-circularon entre los años 1990 y 1992.

Dado que los VIA H3N2 están frecuentemente relacionados con un aumento de mortalidad en adultos mayores a 65 años y en personas con riesgos asociados a complicaciones debido a la enfermedad que este virus causa, es fundamentalmente importante que el componente H3N2 incluido en la vacuna coincida con la cepa circulante. Desde 1972 a la actualidad, el componente vacunal H3N2 fue modificado

veinte veces. Por el contrario los once cambios del componente de influenza B y los siete del componente H1N1 realizados durante el mismo período demuestran la menor variabilidad de estos virus (Pumarola y cols. 2002).

A pesar de la gran variabilidad presente entre las secuencias de las variantes epidémicas, el grado de similitud entre las mismas dentro de una epidemia puede ser sorprendente. Por ejemplo, cepas H3N2 aisladas de regiones geográficamente diferentes durante un período de nueve meses en 1987 mostraron pocos cambios de aminoácidos en sus moléculas de HA (Cox y cols. 1993). La variación antigénica observada en estas cepas parece ser el resultado de la selección hospedador-célula durante el aislamiento y pasaje de los virus en el laboratorio. Los virus de la Influenza de origen humano están rutinariamente adaptados a crecer en huevos embrionados de gallina antes de realizar la caracterización antigénica para propósitos epidemiológicos, y dichos procedimientos resultan en la selección de variantes (Robertson y cols. 1985). Dichas variantes presentan sustituciones únicas de aminoácidos en la HA en la cercanía del sitio de unión al receptor (Robertson 1993), los cuales pueden tener considerables efectos en la antigenicidad del virus (Katz y cols. 1987). Es importante entonces, el monitoreo de las secuencias de HA de tales cambios derivados de laboratorios para distinguirlos de aquellos que ocurren en la naturaleza.

La evolución de la HA de los VIA H3N2 comprende largos periodos (3 a 8 años) de evolución neutral sin un visible cambio antigénico sustancial (periodos estáticos) que están caracterizados por presentar mayor cantidad de sustituciones sinónimas más que no sinónimas, una lenta extinción de linajes de virus que coexisten y poca asociación de remplazos de aminoácidos en regiones de epítotope. Los extensos periodos estáticos están delimitados por cortos periodos de rápida evolución en donde los nuevos linajes dominantes desplazan rápidamente a los linajes anteriormente circulantes. El poder de la selección positiva durante los periodos de rápida evolución está apoyado en un exceso de aminoácidos sustituidos principalmente en las regiones del epítotope de la HA, en relación al remplazo en otras partes de la molécula. En los intervalos de rápida evolución muchos clados muestran evolución dentro de un mismo sub-clado mientras que en los periodos estáticos exhiben una amplia distribución de cambios aminoacídicos a lo largo de toda la molécula de la HA. La evolución de la HA de

los VIA H3N2 se aprecia en los árboles filogenéticos en forma de “cactus”, con un tronco prominente que interpreta la sicesión de linajes de virus sobrevivientes en el tiempo y brazos típicamente cortos que estarían explicando que la mayoría de las cepas se van extinguiendo y que la diversidad viral es limitada en el tiempo (Wolf y cols. 2006; McHardy y cols. 2009), (ver Figura 6).

La evolución antigénica de los VIA H3N2 ha sido marcadamente homogénea a escala global. Una interpretación a esta uniformidad podría ser que los virus circulan globalmente más que persistir y evolucionar localmente (Nelson y cols. 2006).

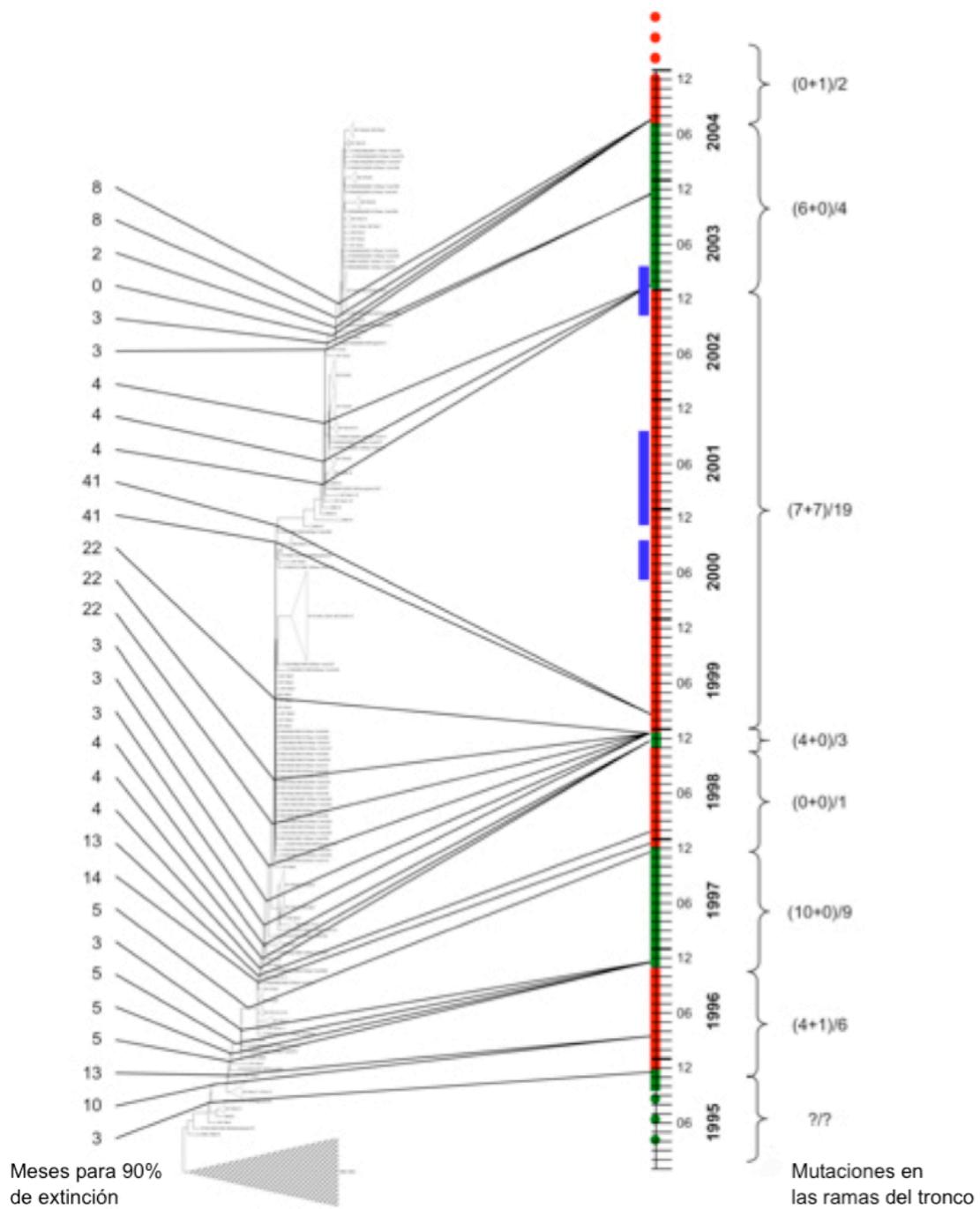


Figura 6. Periodos estáticos y de cambios rápidos de fitness en la evolución del gen HA de VIA H3N2. Los intervalos rojos indican períodos estáticos y los verdes indican cambios rápidos. Las barras azules muestran los intervalos de dominancia H1N1. Los números a la izquierda del árbol indican el tiempo de extinción de los descendientes co-existentes del nodo dado. Las proporciones de la derecha son: mutaciones no sinónimas en los epítomos + mutaciones no sinónimas fuera de epítomos / mutaciones sinónimas en las ramas del tronco. Adaptada de Wolf y cols. 2006.

Estudios realizados sobre la variabilidad genética de VIA en la región sudamericana revelan la co-circulación de diferentes cepas durante la mayoría de las temporadas de Influenza. Al igual que para el caso del VIB, las cepas vacunales se encontraron en clusters diferentes a los de las cepas circulantes, salvo en el año 2007, único año donde la cepa vacunal coincidió genéticamente con la cepa circulante (Goñi y cols. 2009). Esto claramente evidencia y demuestra la necesidad de análisis más profundos de las estirpes de VIA y VIB que circulan en Sudamérica con el fin de observar las relaciones genéticas y antigénicas de estas con las cepas incluidas en la vacuna para el hemisferio sur. En suma, la vigilancia mundial de la Influenza es esencial para brindar información sobre cepas circulantes, ya que su rápida identificación durante la temporada invernal provee valiosa información a las autoridades de salud pública y posibilita una vacunación apropiada y tratamiento profiláctico para grupos de alto riesgo.

3. Objetivos

3.1. Objetivo General

El objetivo principal del presente trabajo es estudiar el grado de variabilidad genética y antigénica del virus Influenza A H3N2 circulante en nuestro país durante la temporada invernal 2011-2012 y comparar el mismo con la cepa vacunal recomendada por la OMS para nuestro hemisferio. Asimismo, estimar las tasas y patrones evolutivos de este virus desde el año 2006 hasta la actualidad representó también otro importante objetivo en este estudio.

3.2. Objetivos Específicos

3.2.1 Puesta a punto mediante técnicas de biología molecular de la amplificación de los segmentos génicos que codifican para las glicoproteínas de superficie HA y NA de Virus Influenza A subtipo H3N2.

3.2.2 Identificar cepas de Virus Influenza A H3N2 circulantes en Uruguay en la temporada invernal 2011-2012, en muestras obtenidas de pacientes del servicio de salud Asociación Española Primera de Socorros Mutuos.

3.2.3 Determinar las relaciones filogenéticas entre las estirpes circulantes estudiadas en Uruguay y las circulantes en las diferentes regiones geográficas.

3.2.4 Determinar las relaciones filogenéticas entre las cepas circulantes en Uruguay y las cepas previstas en la formulación de la vacuna para el año 2011 y 2012 para el hemisferio sur.

3.2.5 Determinar polimorfismos asociados a resistencia a antivirales.

3.2.6 Analizar la dinámica poblacional del Virus de Influenza A H3N2 mediante abordajes bayesianos de coalescencia.

4. Materiales y Métodos

4.1. Muestras

Con el fin de estudiar las relaciones genéticas entre las cepas de influenza que circularon en Uruguay en la temporada invernal 2011-2012, se recolectaron veintinueve muestras (exudados nasales y aspirados naso-faríngeos) de pacientes uruguayos (hospitalizados y ambulatorios) con Enfermedad tipo Influenza (ETI), Insuficiencia Respiratoria Aguda (IRA) e Insuficiencia Respiratoria Aguda Gave (IRAG). La información correspondiente a cada uno de los pacientes se detalla en la tabla 2. Dichas muestras fueron provistas por la Asociación Española Primera de Socorros Mutuos (AEPSM), en el Marco del proyecto Alianza PE_ALI_2009 1 1603 -ANII-AESPM-Facultad de Ciencias, UdelaR. Las muestras fueron tomadas durante los primeros tres días luego de comenzados los síntomas clínicos y posteriormente fueron tipificadas como Influenza A mediante la técnica de Real-Time PCR, de acuerdo a las instrucciones del kit comercial de Roche (Wenzel y cols. 2010) (ver Tabla 2).

Tabla 2. Características clínicas y moleculares de los pacientes analizados. EPOC: Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica. IR: Insuficiencia Respiratoria. IRA: Insuficiencia Respiratoria Aguda. IRAG: Insuficiencias Respiratoria Aguda Grave. NAC: Neumonía Aguda Comunitaria. S/D: Sin dato.

Id.	Toma de muestra	Localidad	EDAD	SEXO	M2	H1N1	DATO CLINICO	MUESTRA
37	07/04/11	Mdeco	57a	M	Positivo	Positivo	Probable neumonía H1N1	Hisopo nasal
45	07/08/11	Mdeco	RN	F	Positivo	Positivo	Recien Nacido	Aspirado Nasofaringeo
48	07/11/11	Canelones	28a	F	Positivo	Positivo	S/D	Hisopo nasal
56	07/13/11	Mdeco	49a	M	Positivo	Positivo	S/D	Hisopo nasal
81	07/25/11	Mdeco	51a	F	Positivo	Negativo	IR	Hisopo nasal
88	07/28/11	Canelones	38a	M	Positivo	Positivo	Broncoespasmo, fiebre, tos, mialgia, odinofagia	Hisopo nasal
90	07/29/11	Mdeco	70a	M	Positivo	Positivo	S/D	Hisopo nasal
92	07/29/11	Mdeco	23a	F	Positivo	Positivo	Neumonía	Hisopo nasal
96	07/29/11	Mdeco	42a	F	Positivo	Positivo	S/D	Hisopo nasal
98	08/01/11	Mdeco	80a	M	Positivo	Positivo	EPOC, bronqueoectasias, fiebre, IR	Hisopo nasal
103	08/04/11	Mdeco	28a	F	Positivo	Positivo	IRA, probable H1N1	Aspirado Nasofaringeo
108	08/05/11	Maldonado	44a	F	Positivo	Positivo	Síndrome de Down, fiebre, tos, IR, compromiso hemodinámico	Aspirado Nasofaringeo
112	08/08/11	Mdeco	63a	M	Positivo	Negativo	Diabetes, obesidad, tos, mialgia, odinofagia, Cefalea, IR	Hisopo nasal
113	08/08/11	Mdeco	5m	M	Positivo	Positivo	Tos, IR, compromiso hemodinámico	Aspirado Nasofaringeo
116	08/09/11	Mdeco	75a	M	Positivo	Negativo	NAC	Hisopo nasal
117	08/09/11	Mdeco	35a	F	Positivo	Positivo	S/D	Hisopo nasal
118	08/09/11	Mdeco	28a	F	Positivo	Positivo	Asma, tos	Hisopo nasal
132	08/15/11	Mdeco	70a	M	Positivo	Negativo	Mialgia, cefalea, IRA	Hisopo nasal
141	08/17/11	Mdeco	62a	M	Positivo	Positivo	S/D	Hisopo nasal
154	08/24/11	Mdeco	62a	F	Positivo	Positivo	IR	Hisopo nasal
159	08/26/11	Mdeco	55a	F	Positivo	Negativo	Obesidad, inmunodepresión, IR, fiebre, tos, mialgias	Hisopo nasal
202	06/07/12	Mdeco	78a	M	Positivo	Negativo	Tos, IRA, fiebre	Hisopo nasal
206	10/07/12	Canelones	1a	S/D	Positivo	Negativo	Descartar Influenza	Aspirado Nasofaringeo
216	23/07/12	Mdeco	82a	M	Positivo	Negativo	NAC severa, tto	Hisopo nasal
220	25/07/12	Mdeco	79a	S/D	Positivo	Negativo	NAC	Hisopo nasal
224	31/07/12	Rocha	67a	F	Positivo	Negativo	Cuadro de gripe, diabetes, neumonitis	Hisopo nasal

4.2. Extracción de ARN

El ARN total fue extraído mediante el uso del kit QIAmp Viral RNA (Qiagen) de acuerdo con instrucciones suministradas por los fabricantes, partiendo de muestras clínicas mencionadas anteriormente. El material así obtenido, fue almacenado a -80°C , para ser utilizado en la síntesis de ADN complementario (ADNc) y posterior amplificación por Reacción en Cadena de la Polimerasa convencional y nested PCR.

4.3. Evaluación 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 $40\ \mu\text{g}/\text{mL}$ ARN, por tanto, el cálculo de la concentración de una muestra de ARN se estima, siendo la concentración del ARN = $\text{Abs}_{260} \times 40\ \mu\text{g}/\text{mL} \times \text{Factor de dilución}$.

Para determinar la pureza de la muestra se midió utilizando el Nanodrop la relación $\text{Abs}_{260}/\text{Abs}_{280}$ la cual debe ser cercana a 2.0 para muestras de ARN puras.

4.4. Transcripción Reversa (TR)

A partir del ARN extraído se realizó la transcripción reversa, mediante la cual el ARN presente en cada muestra fue retrotranscripto a ADNc utilizando como cebador oligonucleótidos cortos al azar (hexámeros). La TR se realizó en un volumen final de $20\ \mu\text{L}$ conteniendo: $5\ \mu\text{L}$ de ARN de concentración conocida en $\text{ng}/\mu\text{L}$, $4\ \mu\text{L}$ de buffer de reacción 5x (el cual contiene: $250\ \text{mM}$ Tris-Hcl, pH 8.3 a temperatura ambiente; $375\ \text{mM}$ KCl; $15\ \text{mM}$ MgCl_2), $1\ \mu\text{L}$ de dNTPs $10\ \text{mM}$, $1\ \mu\text{L}$ de hexameros (50-250 ng), $1\ \mu\text{L}$ de transcriptasa reversa SuperScript II ($200\ \text{U}/\mu\text{L}$; Invitrogen), $2\ \mu\text{L}$ de DTT $0,1\ \text{M}$ y $6\ \mu\text{L}$ de H_2O libre de RNAsa. La reacción se inició con el calentamiento del ARN junto con los

dNTP's y los hexameros, durante 10 minutos (min.) a 65°C, a continuación se colocaron en hielo por un minuto. Seguidamente se agregó a la mezcla de reacción el buffer 5X y el DTT y se incubó todo a 25°C por 2 min. para luego agregar 1µL de la enzima SuperScript II Reverse Transcriptase (RT). Finalmente se incubó la mezcla de reacción en el termociclador Corbett modelo CAS 1200 en las siguientes condiciones: 25°C-10 min./42°C-50 min./70°C-15min. El ADNc así obtenido fue almacenado a -80°C hasta su posterior utilización.

4.5. PCR para GAPDH

Con el fin de evaluar tanto la viabilidad e integridad de los ARNs extraídos como la del ADNc obtenido mediante su TR se procedió a la amplificación mediante PCR de un gen constitutivo como es el gen que codifica para la Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH). GAPDH es uno de los genes constitutivos más comúnmente utilizados en comparaciones de datos de expresión génica. En este sentido, previamente a la amplificación de los genes HA y NA de Influenza A H3N2 se procedió a amplificar GAPDH. De esta forma una amplificación positiva refleja expresión del ARNm de GAPDH. Por lo tanto se puede asegurar la integridad del ARN extraído y su posterior TR.

4.6. Diseño de Oligonucleótidos específicos para la amplificación de los genes HA y NA de Influenza A H3N2

Los oligonucleótidos específicos para la amplificación y secuenciación de 2 de los 8 segmentos, HA y NA, que conforman el genoma de VIA subtipo H3N2 fueron diseñados en el laboratorio de Virología Molecular, Centro de Investigaciones Nucleares, Facultad de Ciencias (Goñi y cols. 2009). Para ello se alinearon utilizando el programa Clustal W secuencias de VIA H3N2 de diferentes regiones del mundo provenientes de la base de datos (Base de Datos de Influenza de los Alamos (FLU LANL database) disponible en <http://www.fludb.org/brc/home.do?decorator=influenza>). De esta forma se diseñaron oligonucleótidos específicos dirigidos a regiones conservadas de los segmentos

génicos a estudiar y amplificar. El largo de cada oligonucleótido fue de entre 20 y 24 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 loops internos en los oligonucleótidos y su posible dimerización para poder ser utilizados como oligonucleótidos. Es importante que la secuencia 3' terminal de un cebador no sea complementario a ningún otro cebador ni consigo mismo, ya que los oligonucleótidos 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 3).

Tabla 3. Nombre, secuencia, posición de los oligonucleótidos diseñados para la amplificación y secuenciación de los segmentos génicos HA y NA. Asimismo se indica el tamaño de banda esperado.

Gen	Oligo	Secuencia del Oligo		Posición en el Gen	Tamaño de fragmento esperado
		5'	3'		
HA	For-3	gaagactatcattgcttgagc		3	1692
HA	Rev-1695	gcaaatgtgcacctaattgtgcc		1695	
HA	For-788	gcacagggaaatctaattgctcc		788	117
HA	Rev-905	ccatttgagtgatgcattcag		905	
NA	For-27	gattggctctgttctctcacc		27	1353
NA	Rev-1380	atcaggccatgagcctgttcc		1380	
NA	For-567	gctgcatgtttgtataacgg		567	266
NA	Rev-833	cactcctcgacatgctgagc		833	

4.7. Reacción en cadena de la polimerasa para los genes HA y NA

Para obtener secuencias completas de los genes que codifican para las proteínas HA y NA se procedió a la amplificación por PCR mediante la utilización de un juego de oligonucleótidos externos para cada región de interés (ver Tabla 3).

La mezcla de reacción para PCR fue preparada en un volumen final de 50 μ L conteniendo: 5 μ L del producto de RT, 5 μ L de buffer 10X (el cual incluía: 200mM Tris-HCl (pH 8.4), 500mM KCl), 1.5 μ L de MgCl₂ 50mM, 1 μ L de dNTPs 10mM, 1 μ L del primer Forward- y 1 μ L del primer Reverse-, ambos de concentración 10 μ M, 0.5 μ L de enzima ADN Polimerasa Taq Platinum 5U/ μ L (Invitrogen) y agua ultra pura libre de ARNasa hasta completar un volumen final de 50 μ L.

Las condiciones de ciclado para la amplificación de HA y NA fueron las siguientes:

- Un ciclo de 94°C por 3 min., donde ocurre la desnaturalización del ADNc y la activación de la ADN polimerasa.
- 40 ciclos a) 94°C por 1 min., permitiendo la desnaturalización del ADN, b) 1 min. a la temperatura de annealing establecida para cada par de oligonucleótidos específicos, c) 72°C por 2min. para la extensión de cadena.

Con el fin de establecer las temperaturas de annealing óptimas de cada par de oligonucleótidos se realizaron varias pruebas usando gradientes de temperatura de acuerdo a las T_m indicadas para cada cebador de forma de poder conocer la temperatura y el tiempo necesario para que se de la unión de los oligonucleótidos al molde. En el caso de HA la temperatura de annealing fue de 53°C, mientras que para la NA fue de 55°C.

En todos los casos se utilizó un control negativo de amplificación (agua ultra pura libre de ARNasas en lugar de ácidos nucleicos) así como un control positivo (ARN proveniente de muestra positiva H3N2). Los productos de PCR fueron almacenados a -20°C hasta realizarse las corridas electroforéticas. La estrategia de amplificación de los 2 segmentos génicos mencionados se observa en la figura 7.

A fin de aumentar la sensibilidad y la especificidad de la PCR utilizada se realizó para aquellos casos que no dieron señal positiva mediante la primer PCR, una segunda ronda de amplificación (nested PCR) mediante la utilización de un juego de oligonucleótidos internos. La mezcla de reacción utilizada en este caso así como las condiciones de amplificación fueron iguales que las realizadas en el primer round pero en este caso la muestra consistió en 1 μ L del producto de amplificación del primer round.

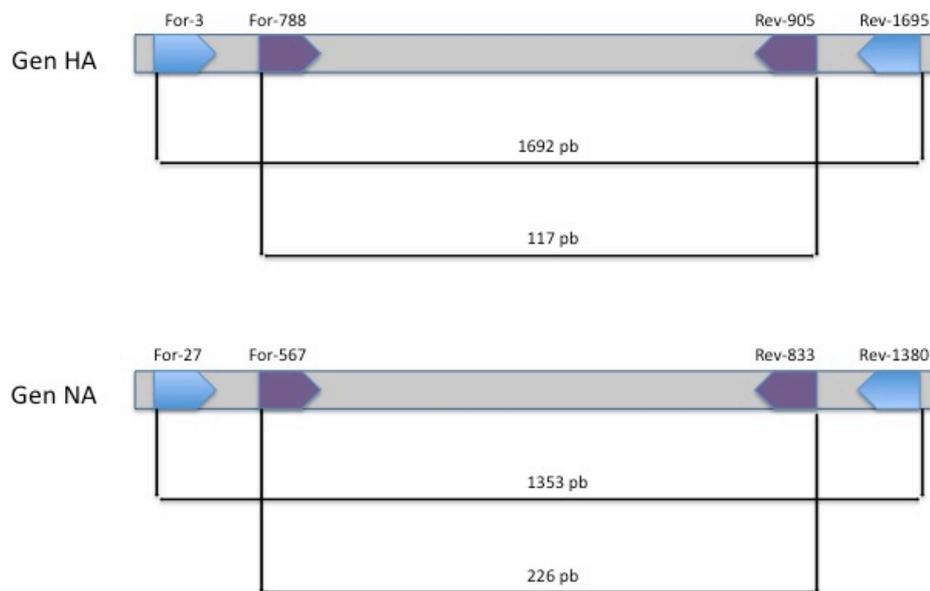


Figura 7. Diagrama representativo de los oligonucleótidos específicos diseñados para la amplificación de los segmentos 4 y 6 correspondientes a HA y NA respectivamente del genoma de Influenza A H3N2. En el diagrama se indica el lugar de unión de cada primer en los segmentos de ARN viral y el tamaño del producto de amplificación obtenido.

4.8. Electroforesis en gel de agarosa

Los productos de PCR fueron separados electroforéticamente en geles de agarosa al 1% teñidos con Good View (Nucleic Acid Stain). Los tamaños de las bandas esperadas para el primer round de los genes HA y NA son 1692 y 1353 respectivamente (Tabla 3).

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 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 μ L del producto de PCR, para cada muestra, control positivo y control negativo, provenientes de una mezcla realizada anteriormente la cual contenía además de dicho producto, 2 μ L de buffer de carga 6X compuesto por azul de bromo fenol y Xilencianol. Además en un pocillo se sembró como referente de corrida un marcador de peso molecular de 1Kb y 100pb correspondiente al primer y segundo round respectivamente (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).

4.9. Purificación 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 oligonucleótidos 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 UA 260 nm = 50 μ g/mL. Se midió la

absorbancia de la muestra a 280 nm para determinar la pureza de la muestra, considerando relaciones $Abs_{260}/Abs_{280} > 1.8$ como muestras de buena calidad.

4.10. Secuenciación

Los productos de PCR fueron enviados para su secuenciación al Servicio de secuenciación del Institut Pasteur de Montevideo. Cada uno de los amplicones correspondientes al primer round fue secuenciado bidireccionalmente por el método de dideoxinucleotidos utilizando los cebadores empleados para la reacción de PCR y cebadores internos, (ver Tabla 3).

4.11. Análisis de secuencias

4.11.1. Análisis Filogenéticos

Los cromatogramas obtenidos fueron analizados y corregidos 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 A H3N2 que circularon 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.

A fin de determinar el modelo evolutivo que mejor describía nuestro juego de datos, se utilizó el programa Model Generator (Keane y cols. 2006) 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 (Guindon 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).

4.12. Estudios Bayesianos de Coalescencia.

Las secuencias completas de nucleótidos correspondientes al segmento génico HA del virus de Influenza A H3N2 fueron alineadas utilizando el programa CLUSTAL W (Thompson y cols. 1994). Una vez alineadas, se determinó la posible presencia de estirpes recombinantes utilizando dos aproximaciones implementadas en el programa SimPlot (Lole y cols. 1999), una basada en un método de ventanas y cálculos de distancias, y otra basada en el método de bootscanning (Salminen y cols. 1995). No se encontraron estirpes recombinantes en nuestros datos de secuencia (datos no mostrados). Una vez establecido que no existían estirpes recombinantes en nuestros datos, establecimos cuál era el modelo evolutivo que mejor representaba nuestros datos de secuencia, utilizando el programa Modelgenerator. El criterio de información de Akaike (AIC) y el máximo valor de verosimilitud indicado por el logaritmo de likelihood (lnL) indicaron que el modelo GTR+ Γ era el que mejor representaba nuestros datos.

Una vez caracterizados estos parámetros se procedió a estudiar las tasas evolutivas y el modo de evolución de VIA H3N2 en Sudamérica. Para ello, se utilizó la aproximación Bayesiana Monte Carlo con Cadenas de Markov (MCMC) implementada en el paquete BEAST (Drummond y Rambaut, 2007), de forma de analizar las cepas de Uruguay y la región sudamericana. Usando el modelo GTR+ Γ y 30 millones de generaciones de

MCMC, se testaron diferentes dinámicas poblacionales (tamaño poblacional constante, skyline bayesiano, crecimiento poblacional exponencial, expansional y logístico), y los resultados se examinaron con el programa TRACER (Drummond y Rambaut, 2007). La incertidumbre estadística en los datos se refleja en la densidad de probabilidad mayor al 95 % (HPD). La convergencia se evaluó con los valores de ESS (tamaño efectivo de muestreo).

Con el objetivo de estimar las tasas evolutivas para las variantes de VIA H3N2 de la región sudamericana se procedió a la realización de estas aproximaciones mediante dos abordajes diferentes en los cuales se utilizaron las muestras de interés, así como también otras extraídas de la base de datos (todas de Latinoamérica). Dado que en la base de datos solo algunas pocas secuencias presentaban la longitud de 1566pb se construyeron dos Dataset diferentes. Uno de ellos constituido por las secuencias de estudio más nueve que presentaban la misma longitud, aisladas entre los años 2007 y 2012 denominado Dataset 1. Otro de ellos que presentaba 971pb de longitud, constituido por nuestras secuencias de interés más 239 secuencias latinoamericanas aisladas entre los años 2000 y 2012, el mismo fue designado como Dataset 2.

5. Resultados

5.1. Puesta a punto de la amplificación mediante RT-PCR de los segmentos génicos HA y NA de VIA H3N2.

Con el fin de estudiar la variabilidad genética de VIA H3N2 en las muestras estudiadas de Uruguay, se procedió en una primera instancia a la optimización de la reacción de PCR para la amplificación de los genes HA y NA de VIA subtipo H3N2.

A modo de poder conocer la temperatura de annealing óptima para cada uno de los primers utilizado, se procedió a la realización de una PCR en gradiente de temperaturas, para cada uno de los segmentos génicos. De esta forma se determinó la temperatura de annealing óptima para cada uno de los genes estudiados: 53°C para el segmento HA y 55°C correspondiente al segmento NA, siendo éstas las temperaturas donde se obtuvo una única banda y de buena intensidad, (ver Tabla 4, Figura 8).

Tabla 4. Temperatura de annealing para la amplificación de los genes HA y NA.

Gen	Temperatura (°C)	Tiempo (min)
HA	53	1
NA	55	1

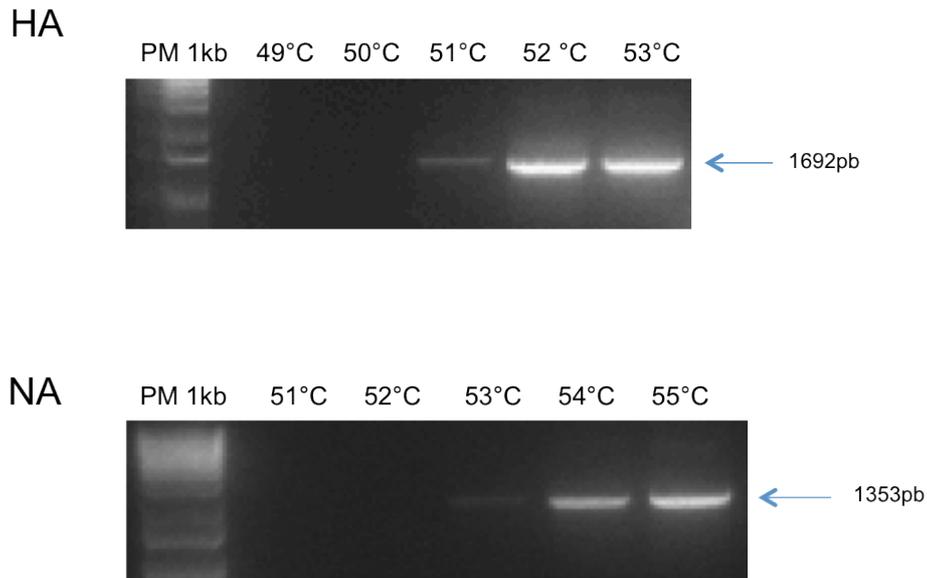


Figura 8. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de amplificación generados durante la optimización de la PCR para los genes HA y NA. HA) Carril 1: marcador de peso molecular de 1Kb (BioLabs); carriles 2, 3, 4, 5, y 6 productos obtenidos a diferentes temperaturas de annealing. Se observa la banda de 1692pb correspondiente a la amplificación del gen HA. NA) Carril 1: marcador de peso molecular de 1Kb (BioLabs); carriles 2, 3, 4, 5 y 6 productos obtenidos a diferentes temperaturas de annealing. Se observa la banda de 1353pb correspondiente a la amplificación del gen NA.

5.2 Identificación y caracterización de las cepas de Virus Influenza A H3N2 de las muestras obtenidas en Uruguay durante la temporada invernal 2011-2012.

Una vez optimizada la técnica de RT-PCR para los genes HA y NA de H3N2, se procedió a la caracterización molecular de las veintinueve muestras de este estudio (Tabla 2).

Como se puede observar en la tabla, de las veintinueve muestras recolectadas solo 10 fueron positivas para el segmento génico M2 (indicando que es VIA) y negativas para el sub-tipo H1N1. A fin de determinar si estas 10 muestras podían pertenecer al sub-tipo H3N2 de VIA se procedió a realiza la reacción de PCR para los genes HA y NA.

Mediante esta estrategia se obtuvo para el gen NA un producto de amplificación de 1353pb correspondiente a la primera ronda de amplificación en siete de las diez muestras analizadas (muestras 116, 132, 159, 202, 206, 220 y 224) (Figura 9). Asimismo se obtuvo un producto de amplificación de 266pb mediante la amplificación con primers internos en 9 de las 10 muestras analizadas (resultados no mostrados).

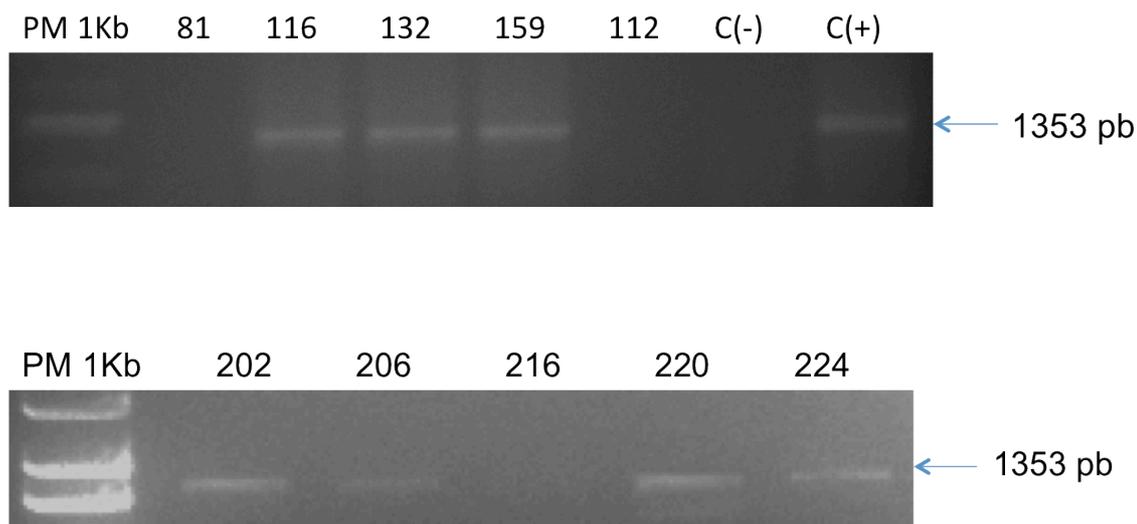


Figura 9. Electroforesis en gel de agarosa de los productos correspondientes a la primera ronda de amplificación del gen NA. En ambas fotos se indica en Carril 1: marcador de peso molecular de 1Kb (BioLabs); Carriles 2, 3, 4, 5 y 6: muestras analizadas, Control positivo (C(+)), control negativo (C(-)). Se observa la banda de 1353pb correspondiente a la amplificación del gen NA.

Por otro lado, en lo que respecta al gen HA, se obtuvo un producto de amplificación de 1692pb correspondiente a la primera ronda de amplificación. Dicha banda se observa en las siete muestras antes mencionadas (Figura 10). Mediante la utilización de primers internos se obtuvo una banda específica de 117 pb en 9 de las 10 muestras analizadas (resultados no mostrados).

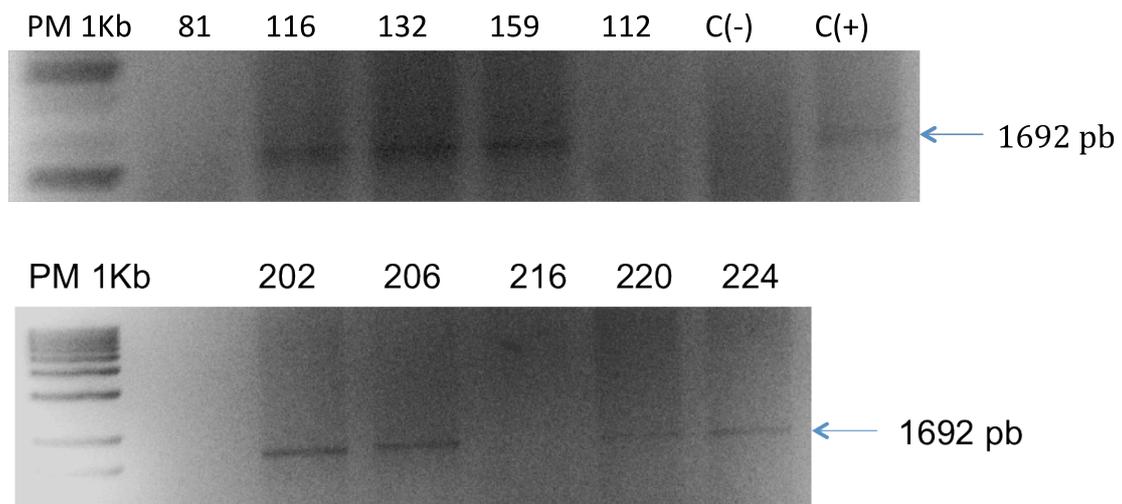


Figura 10. Electroforesis en gel de agarosa de los productos correspondientes a la primera ronda de amplificación del gen HA. En ambas fotos se indica en Carril 1 marcador de peso molecular de 1Kb (BioLabs); Carriles 2, 3, 4, 5 y 6 muestras analizadas, Control positivo (C(+)), control negativo (C(-)). Se observa la banda de 1692pb correspondiente a la amplificación del gen HA.

En suma luego de la amplificación por PCR de los genes HA y NA del VIA H3N2 de las muestras recolectadas para este estudio (ver Tabla 2), se pudo evidenciar que 7 de las mismas resultaron positivas para ambos genes estudiados luego de una primera ronda de amplificación. Este número se vio incrementado a 9 luego de la realización de una segunda ronda de amplificación con primers internos, lo cual permite un aumento en la sensibilidad y especificidad de la PCR (ver Tabla 5).

Tabla 5. Muestras analizadas en este estudio. Se muestra Número de caso, , Primer Round, Segundo Round y Tipo de muestra.

Número de muestra	Primer Round	Segundo Round	Tipo de muestra
81	Negativo	Positivo	Hisopo nasal
116	Positivo	Positivo	Hisopo nasal
132	Positivo	Positivo	Hisopo nasal
159	Positivo	Positivo	Hisopo nasal
112	Negativo	Negativo	Hisopo nasal
202	Positivo	Positivo	Hisopo nasal
206	Positivo	Positivo	Aspirado Nasofaringeo
216	Negativo	Positivo	Hisopo nasal
220	Positivo	Positivo	Hisopo nasal
224	Positivo	Positivo	Hisopo nasal

A fin de caracterizar las estirpes virales identificadas en este estudio, los amplicones obtenidos fueron purificados de acuerdo a lo establecido en materiales y métodos, y posteriormente fueron secuenciados bidireccionalmente por el método de dideoxinucleotidos utilizando los cebadores empleados para la reacción de PCR y cebadores internos, (ver Tabla 2). En lo que respecta a la realización de los análisis filogenéticos se utilizó la información correspondiente a las secuencias amplificadas en el primer round, esto es debido a que dichas secuencias contienen mayor cantidad de información nucleotídica lo cual aporta mayor robustez a nuestros análisis. Se obtuvieron secuencias de buena calidad para su posterior análisis en 6 de las 7 muestras secuenciadas.

Las secuencias obtenidas en este trabajo así como las provenientes del banco de datos (FLU LANL database), fueron alineadas utilizando el programa Clustal W (Thompson y cols. 2004). Una vez realizado los alineamientos para cada segmento génico, se determinó el modelo que mejor describe nuestro conjunto de datos de secuencias para cada alineamiento en particular. El criterio de información de Akaike (AIC) y el máximo valor de verosimilitud indicado por el logaritmo del likelihood (lnL) indicaron que los modelos de sustitución GTR y TN93 son los que mejor ajustan nuestro set de datos. Todos los análisis se realizaron utilizando el programa PhyML (Guidon y cols. 2005)

(disponible en: <http://www.phylogeny.fr/phylo.cgi/phym1>). La robustez de cada nodo fue evaluada por un ensayo de probabilidad aproximado (aLRT).

En primera instancia, mediante la construcción de alineamientos utilizando los marcos abiertos de lectura (ORF) correspondiente a la información génica de los segmentos HA y NA de las muestras estudiadas y de las diferentes variantes de dichos genes existentes hasta el momento, extraídos de la base de datos mencionada anteriormente, se realizaron árboles filogenéticos de máxima verosimilitud bajo el modelo TN93 (Figura 11).

a) HA

b) NA

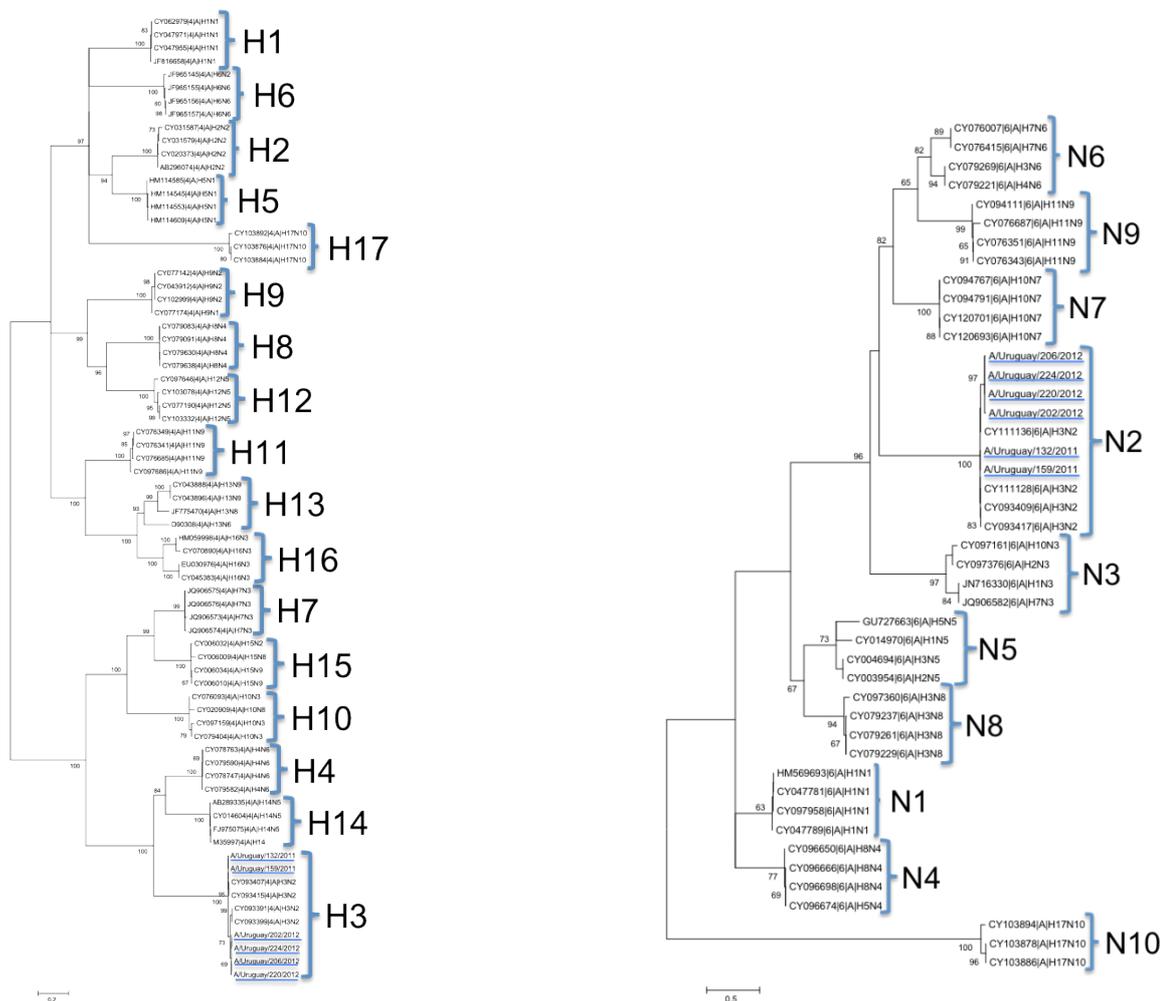
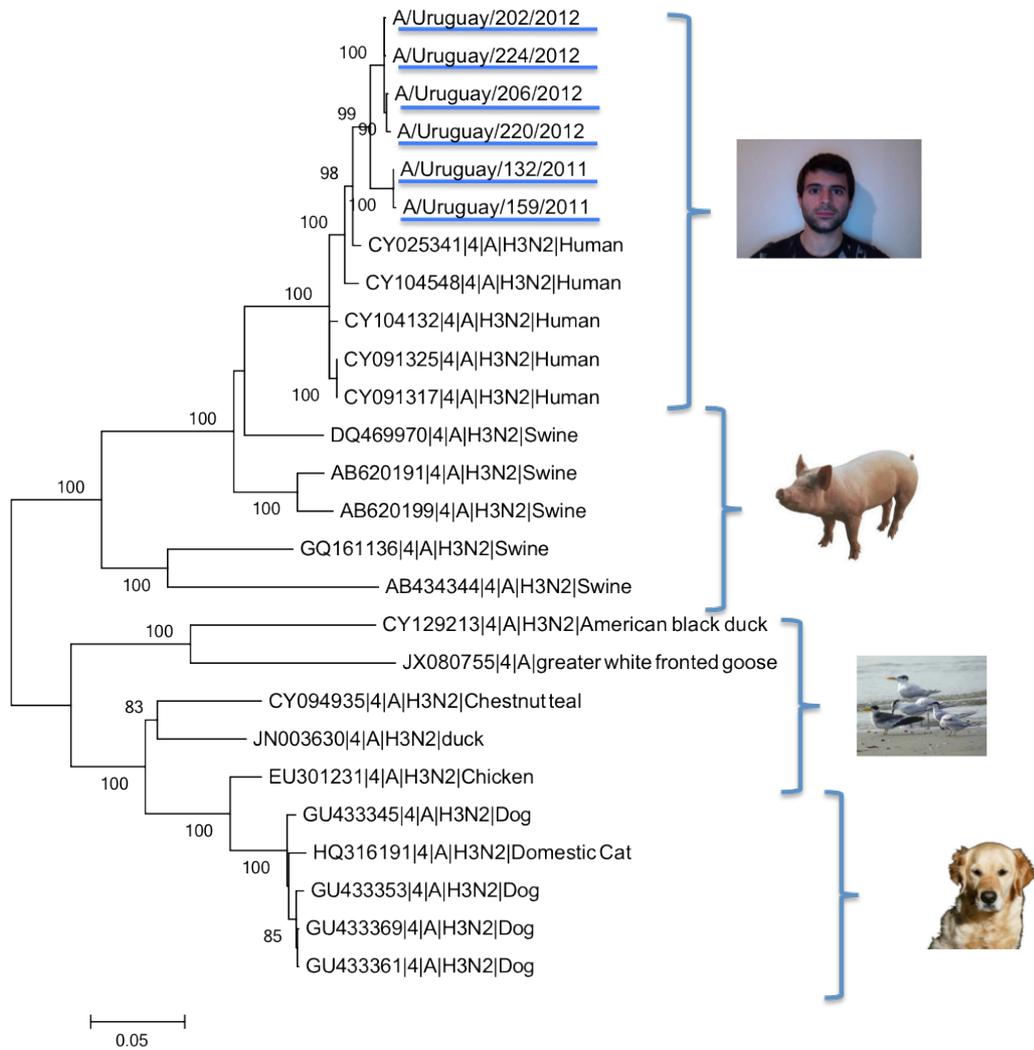


Figura 11. Árbol filogenético de máxima verosimilitud utilizando la información génica de los segmentos a) HA(1566pb) y b) NA(1353pb), correspondientes a las muestras estudiadas y a los diferentes subtipos de HA y NA existentes al momento. El árbol filogenético fue obtenido mediante la utilización del modelo evolutivo TN93 y el método de máxima verosimilitud. Las diferentes cepas indican el subtipo y número de acceso al GenBank. Los números en cada nodo indican los valores de aLTR. La barra en la parte inferior de la figura denota distancia. Las cepas subrayadas en azul son las correspondientes a este estudio.

En la figura 11, se pueden apreciar los árboles filogenéticos de máxima verosimilitud correspondientes a los genes HA y NA. Como se puede observar en esta figura existen claras agrupaciones que corresponden a las diferentes variantes de dichos genes existentes en la naturaleza al momento del estudio. Respecto al árbol filogenético correspondiente al segmento génico HA (Figura 11.a) se pueden observar diecisiete clusters bien diferenciados, cada uno de ellos constituido por cepas de las variantes HA encontradas al presente. Por otro lado, observando el árbol filogenético que corresponde al segmento NA (Figura 11.b), se pueden evidenciar diez clusters claramente definidos constituidos por las variantes NA presentes en la naturaleza al momento del presente análisis. En lo que refiere a las muestras Uruguayas analizadas en este estudio (subrayadas en azul), las mismas se agrupan junto con las cepas pertenecientes al subtipo H3 en el caso de la hemaglutinina y al subtipo N2 en el caso de la neuraminidasa. Como forma de garantizar nuestros resultados nos apoyamos en el alto peso estadístico de estos análisis indicados por valores de aLTR por encima de 60. Este estudio nos permitió determinar que 6 de las 10 muestras estudiadas pertenecían al subtipo H3N2 del VIA.

Por otro lado, se realizaron alineamientos utilizando los ORF de los genes HA y NA de las muestras uruguayas estudiadas en este trabajo junto con los ORF de las cepas circulantes entre los distintos hospederos con el objetivo de evidenciar el origen de los segmentos HA y NA de las muestras analizadas. Con dicho alineamiento se realizaron árboles filogenéticos de máxima verosimilitud bajo el modelo GTR (ver Figura 12).

a) HA



b) NA

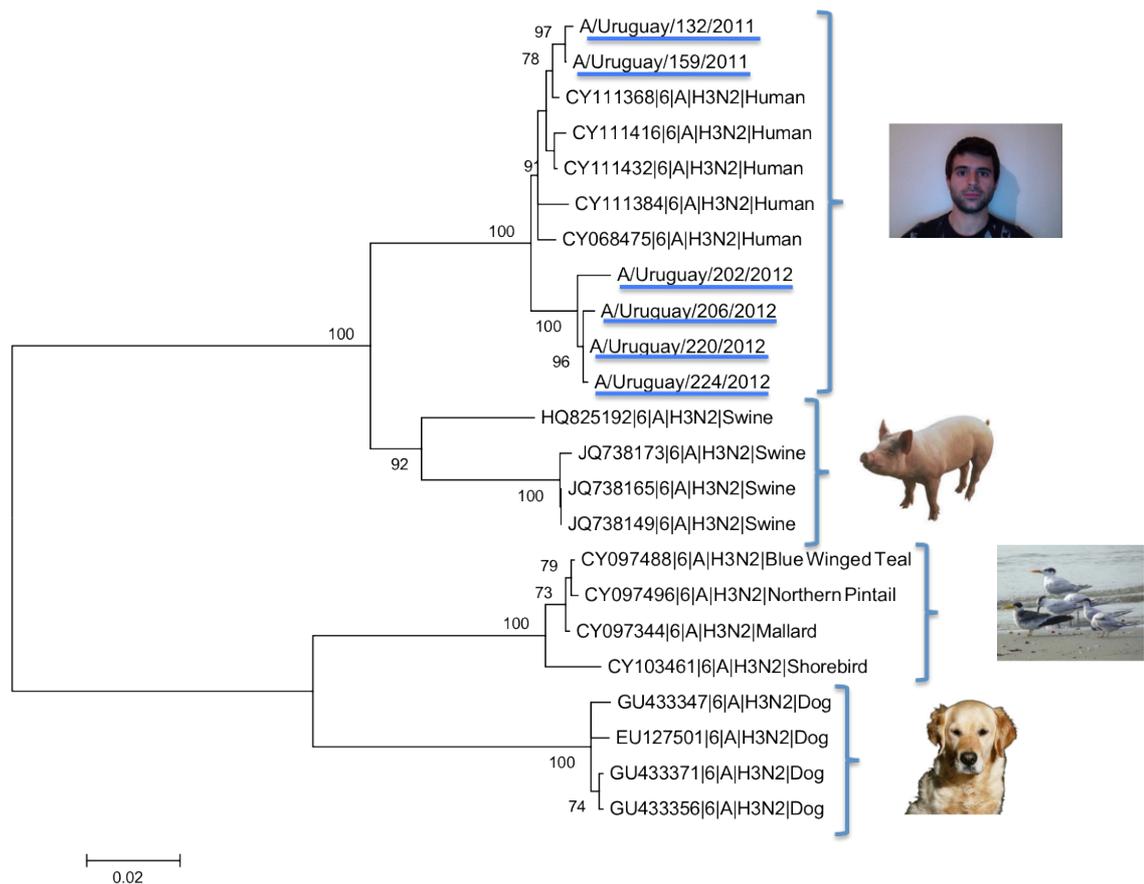


Figura 12. Árbol filogenético de máxima verosimilitud utilizando la información génica de: a) HA y b) NA, correspondientes a la muestra Uruguayas estudiadas y a cepas aisladas de diferentes hospederos. Los árboles filogenéticos fueron obtenidos mediante la utilización del modelo evolutivo GTR y el método de máxima verosimilitud. Se indica hospedero y número de acceso al GenBank de cada cepa. Los números en cada nodo indican los valores de aLTR. La barra en la parte inferior de la figura denota distancia. Las muestras pertenecientes a los pacientes uruguayos se encuentran subrayadas en azul.

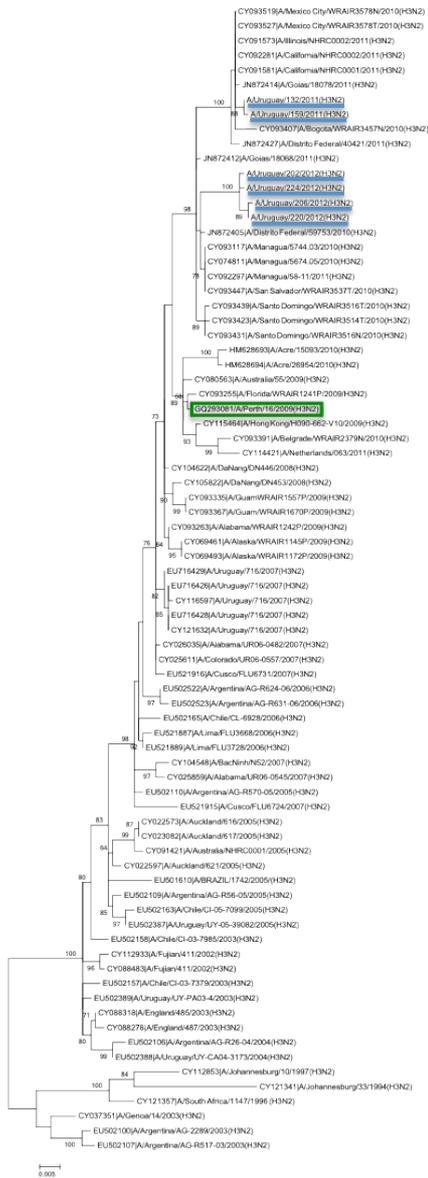
Como se puede apreciar en la figura 12, los árboles filogenéticos de máxima verosimilitud para los genes HA y NA muestran claramente que las cepas correspondientes a los diferentes hospederos agrupan entre sí, es decir, las cepas aisladas de hospederos porcinos se agrupan con cepas porcinas, las aisladas de hospederos aviares agrupan junto con las cepas aviares y así sucesivamente. En lo que refiere a las muestras Uruguayas analizadas en este estudio (subrayadas en azul), las mismas se agrupan junto con las cepas pertenecientes al cluster donde se ubican las cepas humanas, tanto para el caso de la hemaglutinina como para el caso de la neuraminidasa. Nuestros resultados son sustentados fuertemente por los altos valores de aLTR obtenidos, dando alta robustez estadística a dichos análisis.

5.3. Determinación de las relaciones filogenéticas entre las estirpes circulantes en Uruguay y en diferentes regiones geográficas respecto a la cepa vacunal.

A fin de profundizar en el conocimiento de las relaciones filogenéticas existentes entre la cepa H3N2 incluida en la vacuna del hemisferio sur para la temporada invernal 2011-2012 y las cepas de VIA H3N2 de Uruguay, la región y el mundo, las secuencias de los segmentos génicos HA y NA obtenidas de los pacientes uruguayos de los años 2011 y 2012 fueron alineadas con secuencias correspondientes a cepas de VIA H3N2 de distintas partes del mundo y la región Latinoamericana, así como también con la cepa vacunal para la temporada 2011 y 2012 obtenidas de la base de datos de Influenza los Alamos (FLU LANL database), (Bao y cols 2008).

Los alineamientos fueron realizados utilizando los ORF de los genes HA y NA. Una vez realizado el alineamientos para cada segmento génico se crearon árboles filogenéticos de máxima verosimilitud bajo el modelo GTR, el que mejor describe nuestro set de datos (ver Figura 13 y 14).

a)



b)

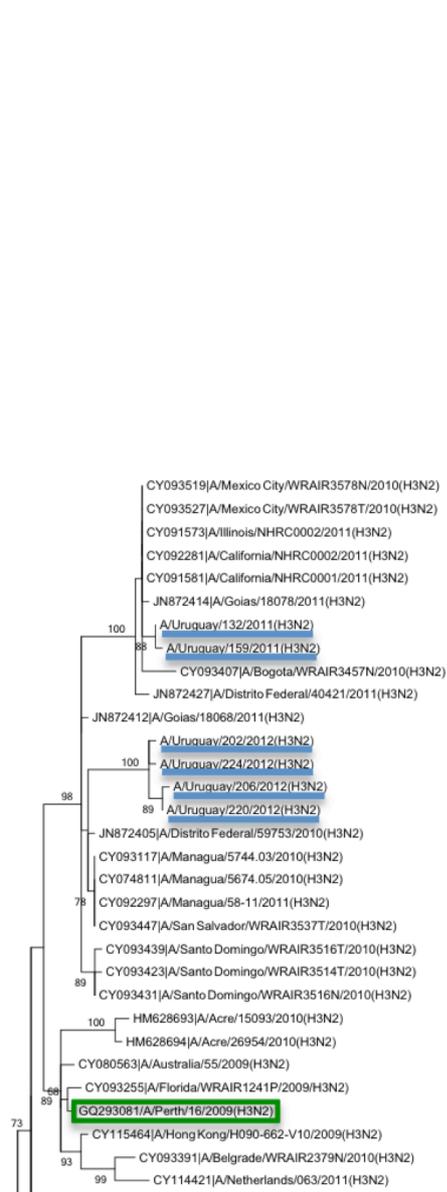
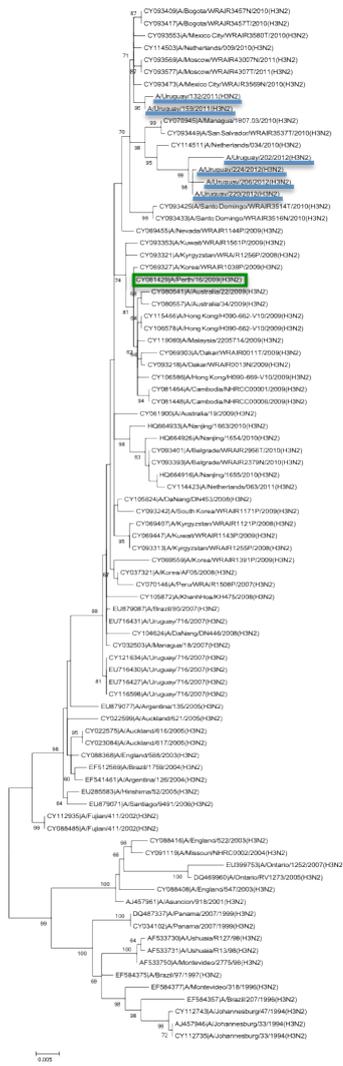


Figura 13. a) Árbol filogenético de máxima verosimilitud utilizando la información génica de los segmentos HA, correspondientes a las muestras analizadas en este estudio (subrayadas en azul). El árbol filogenético fue obtenido mediante la utilización del modelo evolutivo GTR y el método de máxima verosimilitud. Las diferentes cepas indican la procedencia y número de acceso al GenBank, dentro de estas se evalúa la muestra CQ293081/A/Perth/16/2009(H3N2), la cual fue designada como cepa vacunal para el hemisferio sur en el año 2011 (recuadro verde). Los números en cada nodo indican los valores de aLTR. La barra en la parte inferior de la figura denota distancia. b) Amplificación de la región del árbol filogenético correspondiente a las cepas uruguayas y a la cepa vacunal.

a)



b)

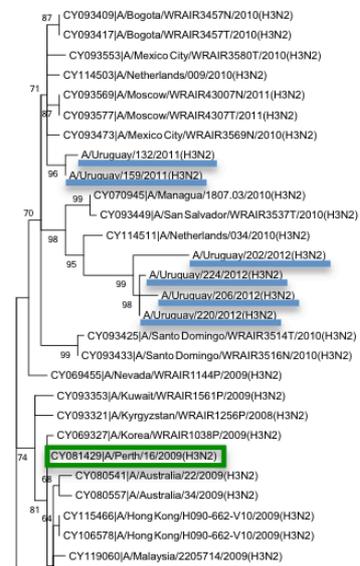


Figura 14. a) Árbol filogenético de máxima verosimilitud utilizando la información génica de los segmentos NA. El árbol filogenético fue obtenido mediante la utilización del modelo evolutivo GTR y el método de máxima verosimilitud. Las diferentes cepas indican la procedencia y número de acceso al GenBank, dentro de estas se evalúa la muestra CY081429/A/Perth/16/2009(H3N2), la cual fue designada como cepa vacunal para el hemisferio sur en el año 2011 (recuadro verde). Las muestras analizadas en este estudio se muestran subrayadas en azul. Los números en cada nodo indican los valores de aLTR. La barra en la parte inferior de la figura denota distancia. b) Amplificación de la región del árbol filogenético correspondiente a las cepas uruguayas y a la cepa vacunal.

Como se muestra en las figuras 13 y 14, los árboles filogenéticos de máxima verosimilitud correspondientes a los genes HA y NA respectivamente, evidencian una topología similar en cuanto a que no hay un cluster único para las muestras de este estudio (subrayadas en azul). Se puede observar en ambos análisis una clara divergencia entre las cepas uruguayas de las temporadas invernales 2011 y 2012, lo que queda en evidencia por la distancia filogenética apreciada entre estas variantes. Asimismo se pueden ver para ambos genes, pero más notoriamente para la HA, grandes diferencias filogenéticas entre las cepas de estudio y otras cepas uruguayas utilizadas en este análisis, pertenecientes a años anteriores.

Por otro lado, en ambos análisis se puede apreciar una notable distancia filogenética entre las cepas estudiadas y la cepa H3N2 vacunal recomendada por la OMS correspondiente al periodo de estudio (recuadro en verde).

5.4. Determinar polimorfismos asociados a resistencia a antivirales

5.4.1. Resistencia a adamantanos

Con el propósito de estudiar la presencia de cepas de virus Influenza A/H3N2 resistentes a los adamantanos circulantes en Uruguay en los años 2011 y 2012, se analizó la presencia de cambios aminoacídicos característicos de la proteína HA asociados a esta resistencia en cepas de VIA (H3) de Uruguay y la región. Las secuencias correspondientes al segmento génico HA obtenidas en este estudio fueron alineadas con secuencias de Uruguay y la región conjuntamente a la secuencia de la cepa vacunal VIA H3N2 (A/Perth/16/2009 (H3N2)), la cual fue recomendada para el hemisferio sur por la OMS desde el 2009 en adelante. Posteriormente a su alineamiento, las secuencias nucleotídicas fueron traducidas a aminoácidos observándose las sustituciones que se muestran en la figura 15.

Al observar la figura 15 podemos apreciar que todas las muestras uruguayas de las temporadas 2011 y 2012 (indicadas en rojo) muestran los polimorfismos característicos de las cepas resistentes a los adamantanos (S193F y D225N), característica que también comparten las cepas uruguayas de los años 2005 y 2007. Analizando la figura, también se puede ver que las secuencias aminoacídicas de las muestras analizadas en este estudio comparten además con las cepas uruguayas reportadas hasta el momento el cambio de una K (Lisina) por una N (Asparagina) en la posición 145 (K145N) y el cambio de una Valina por Isoleucina en la posición 226 (V226I). Asimismo se puede observar que las cepas pertenecientes a las temporadas 2011 y 2012 adquieren nuevas mutaciones no sinónimas, derivando en los siguientes cambios: K158N, K173Q, N189K, T212A, V223I, V226I. La gran mayoría de estas sustituciones son encontradas también en la cepa vacunal.

Como se puede observar en la figura ninguna otra cepa aislada de Sudamérica previo a 2005 tiene los polimorfismos que indican resistencia a los adamantanos.

5.4.2. Resistencia a inhibidores de Neuraminidasa

Con la finalidad de analizar la existencia de cepas resistentes a los inhibidores de NA en las muestras obtenidas para este análisis en el periodo comprendido entre los años 2011 y 2012, se estudió la presencia de cambios aminoacídicos característicos del sitio activo de la glicoproteína NA en las cepas de VIA (H3N2) de Uruguay y la región. Las secuencias correspondientes al segmento génico NA obtenidas en este trabajo fueron alineadas con secuencias de Uruguay y la región, asimismo en este alineamiento se incluyó la secuencia de la cepa vacunal VIA H3N2 (A/Perth/16/2009 (H3N2)), la cual fue recomendada para el hemisferio sur desde el 2009 a la fecha. Seguidamente se procedió a la traducción de la secuencia nucleotídica. Las sustituciones aminoacídicas se muestran en la figura 16.

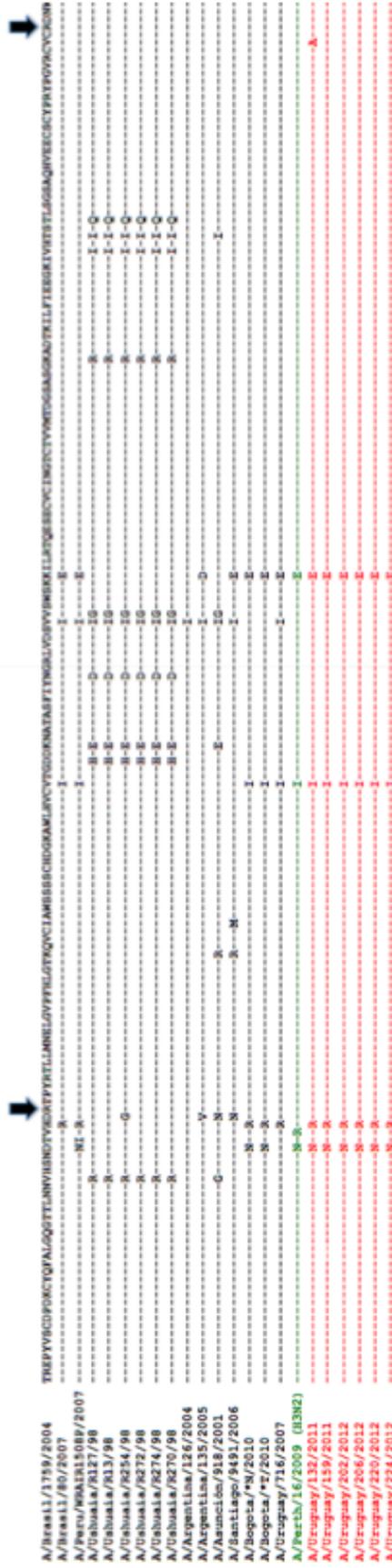


Figura 16. Alineamiento de la secuencia aminoacídica de NA de cepas de influenza A provenientes de Sudamérica. Las cepas se muestran por su nombre a la izquierda de la figura. Se observan las secuencias aminoacídicas de NA desde la posición 117 a la 296 (relativa a la cepa A/Brasil/1759/2004). Los cambios aminoacídicos característicos se indican con las flechas en las posiciones 152 (Argentina por Lisina; R152K) y 292 (R292K) del sitio activo de la proteína NA de los virus resistentes a ozeltamivir o zanamivir. Las líneas indican identidad de secuencia con la cepa A/Brasil/1759/2004.

Como se observa en la figura ninguna de las cepas uruguayas de los años 2011 y 2012, ni las cepas utilizadas como referencia presentan cambios aminoacídicos característicos de cepas resistentes a inhibidores de NA (oseltamivir y zanamivir).

Sin embargo, se puede observar que las cepas del presente estudio comparten cambios aminoacídicos como ser un Ácido Aspártico (D) por una Asparagina (N) en la posición 147, Histidina (H) 150 por Arginina (R), Valina (V) por Isoleucina (I) en la posición 194, Lisina (K) 121 por Ácido Glutámico (E). Dichos cambios también se pueden apreciar para la cepa vacunal.

5.5. Análisis de la dinámica poblacional del virus de influenza A H3N2 mediante abordajes bayesianos de coalescencia

La teoría de la coalescencia establece que todos los genes o alelos en una población determinada son heredados de un ancestro único y compartido por todos los miembros de la población, conocido como el ancestro común más reciente (MRCA) (Kingman 2000).

La teoría básica de coalescencia asume que los genes no sufrieron procesos de recombinación y modela la deriva génica como un proceso estocástico conocido como un proceso de Markov (Rice, 2004). Se han realizado importantes contribuciones al desarrollo de la teoría de coalescencia, que permitieron la incorporación de variaciones en el tamaño de la población, recombinación y selección, así como también la inclusión de prácticamente cualquier modelo de evolución arbitrariamente complejo o modelos demográficos en el análisis de genética de poblaciones (Kaplan y cols., 1988; Hudson 1991; Donnelly y Tavaré 1995; Neuhauser y Krone 1997; Slatkin, 2001).

Con el objetivo de analizar la dinámica poblacional del virus Influenza A H3N2 en la región sudamericana, procedimos a realizar análisis de coalescencia.

A efectos de analizar las secuencias correspondientes al segmento génico HA subtipo H3, de cepas de Uruguay y la región, se utilizó la aproximación Bayesiana Monte Carlo con Cadenas de Markov (MCMC). Con este fin se seleccionaron secuencias seriadas en

el tiempo dentro de las cuales se encontraban las obtenidas en el presente estudio y secuencias de la región sudamericana.

Con el propósito de estimar las tasas evolutivas para las variantes de VIA H3N2 de la región sudamericana se procedió a la realización de estos análisis mediante dos abordajes diferentes en los cuales se utilizaron nuestras variantes de interés, así como también otras extraídas de la base de datos (todas de Latinoamérica). Se analizó un set de datos constituido por las secuencias de las seis muestras estudiadas en este trabajo junto con otras nueve secuencias latinoamericanas obtenidas entre los años 2007 y 2012, bajadas de la base de datos antes mencionada, sumando en total quince secuencias que presentan el mismo tamaño (1566pb), denominado Dataset 1. Debido a que eran escasas las secuencia de este tamaño presentes en la base de datos, pero sí habían muchas de un tamaño menor (971pb), se realizó el mismo análisis pero con un set de datos constituido por nuestras secuencias de estudio más 239 secuencias latinoamericanas obtenidas entre los años 2000 y 2012, designado Dataset 2 (ver Figura 17).

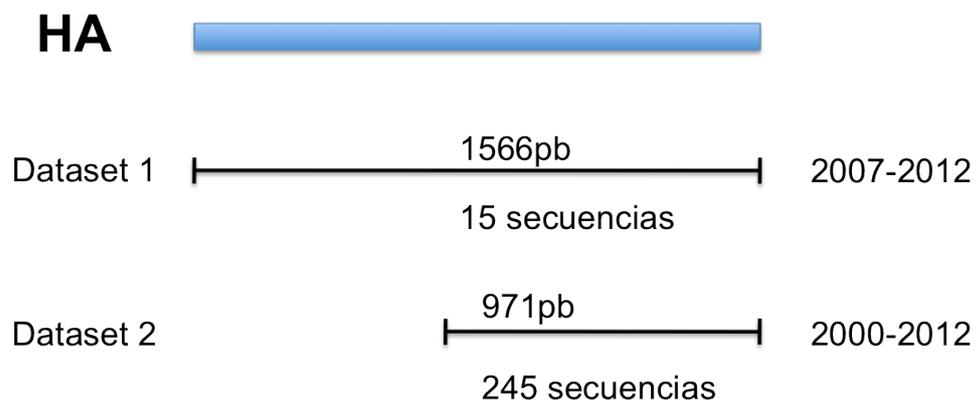


Figura 17. Esquema representativo de los dos abordajes utilizados para el análisis Bayesiano de Coalescencia. Dataset 1 incluye 15 secuencias de una longitud aproximada de 1566pb, seriadas en el tiempo (2007 a 2012). Dataset 2 constituido por 245 secuencias seriadas en el tiempo (2000 a 2012) de 971pb de extensión. Ambos incluyen las secuencias de las muestras aisladas en este trabajo.

Luego de realizar un análisis de 30 millones de generaciones de MCMC, usando el modelo GTR+ Γ , un reloj molecular relajado y testeando diferentes dinámicas poblacionales (tamaño poblacional constante, skyline bayesiano, crecimiento poblacional exponencial, expansional y logístico).

Se estimaron tasas evolutivas de $4,47 \times 10^{-3}$ y $5,19 \times 10^{-3}$ sustituciones por sitio por año (s/s/a), para los Datasets 1 y 2 respectivamente (Ver Tabla 6 y Figura 18).

Tabla 6. Análisis Bayesiano de Coalescencia correspondiente a secuencias de VIA H3N2 sudamericanas. Comparación con datos reportados por Nelson en el 2006 y Pybus en el 2009, de VIB y H1N1.

Región analizada	Tasa evolutiva $\times 10^{-3}$ sust./sitio/año
1566pb	4,47
971pb	5,19
H3N2 (Nelson, 2006)	2,68-12,5
Influenza B (Nelson, 2006)	1,14-3,32
H1N1 (Pybus, 2009)	3,5

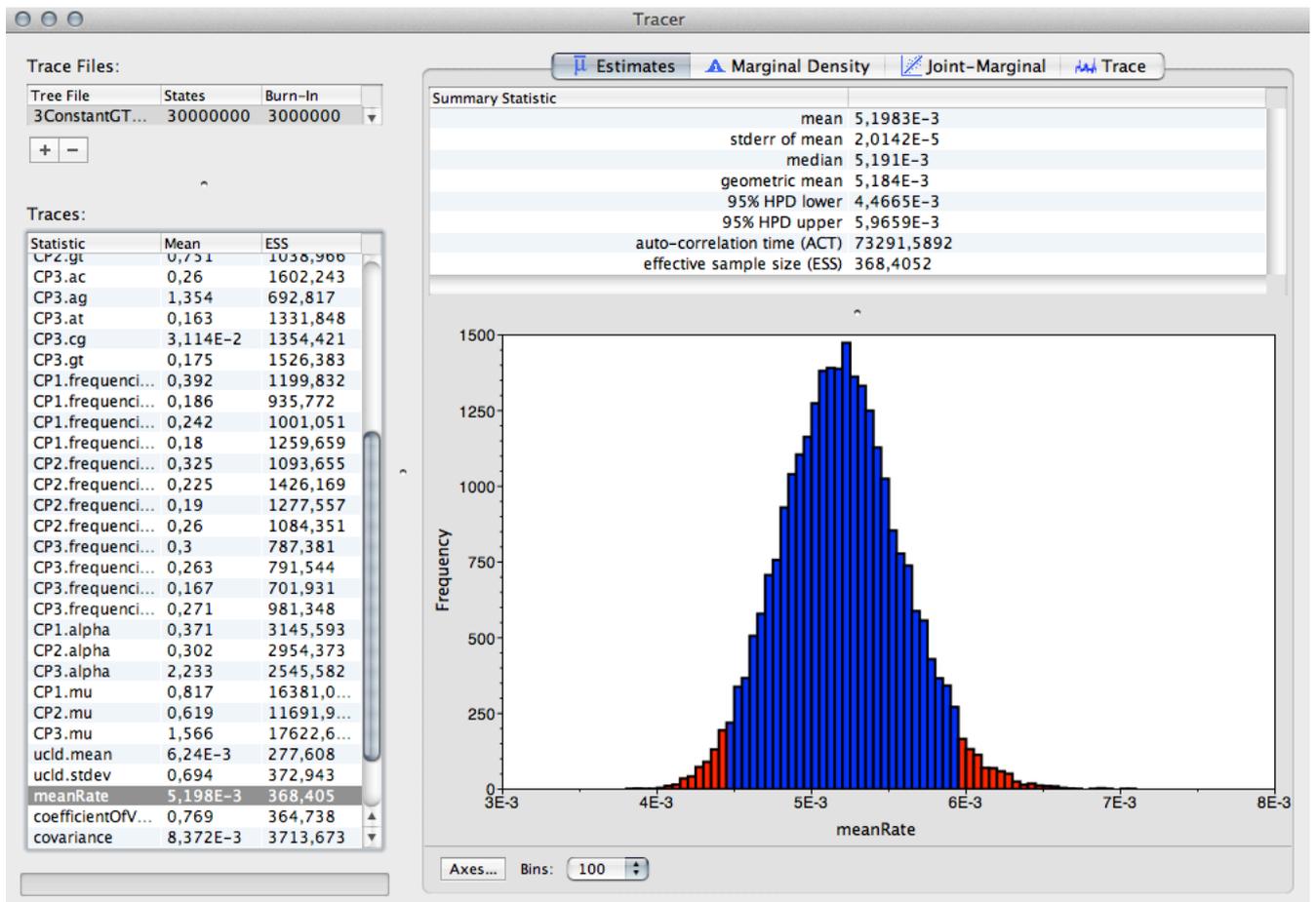


Figura18. Representación gráfica del análisis Bayesiano de Coalescencia correspondiente al Dataset 2. Se observa la tasa evolutiva de $5,19 \times 10^{-3}$ sust./sitio/año. La forma característica de campana revela el alto peso estadístico del análisis.

En la figura 18 se puede apreciar la representación gráfica del análisis Bayesiano de Coalescencia correspondiente al set de datos 2 (secuencias de 971pb de longitud). La misma muestra la forma característica en campana lo que revela la alta robustez estadística del análisis. Se observa marcado en gris una tasa evolutiva de $5,19 \times 10^{-3}$ sust./sitio/año, y un ESS (tamaño efectivo de muestreo) de 368.

Asimismo observando la tabla 6, podemos ver como las tasas evolutivas obtenidas para ambos set de datos se encuentran dentro del rango establecido (tasas evolutivas de entre $2,68-12,5 \times 10^{-3}$ sust./sitio/año).

Asimismo se analizaron las frecuencias de cambios en las diferentes posiciones del codón, lo que se puede apreciar en la Figura 19.

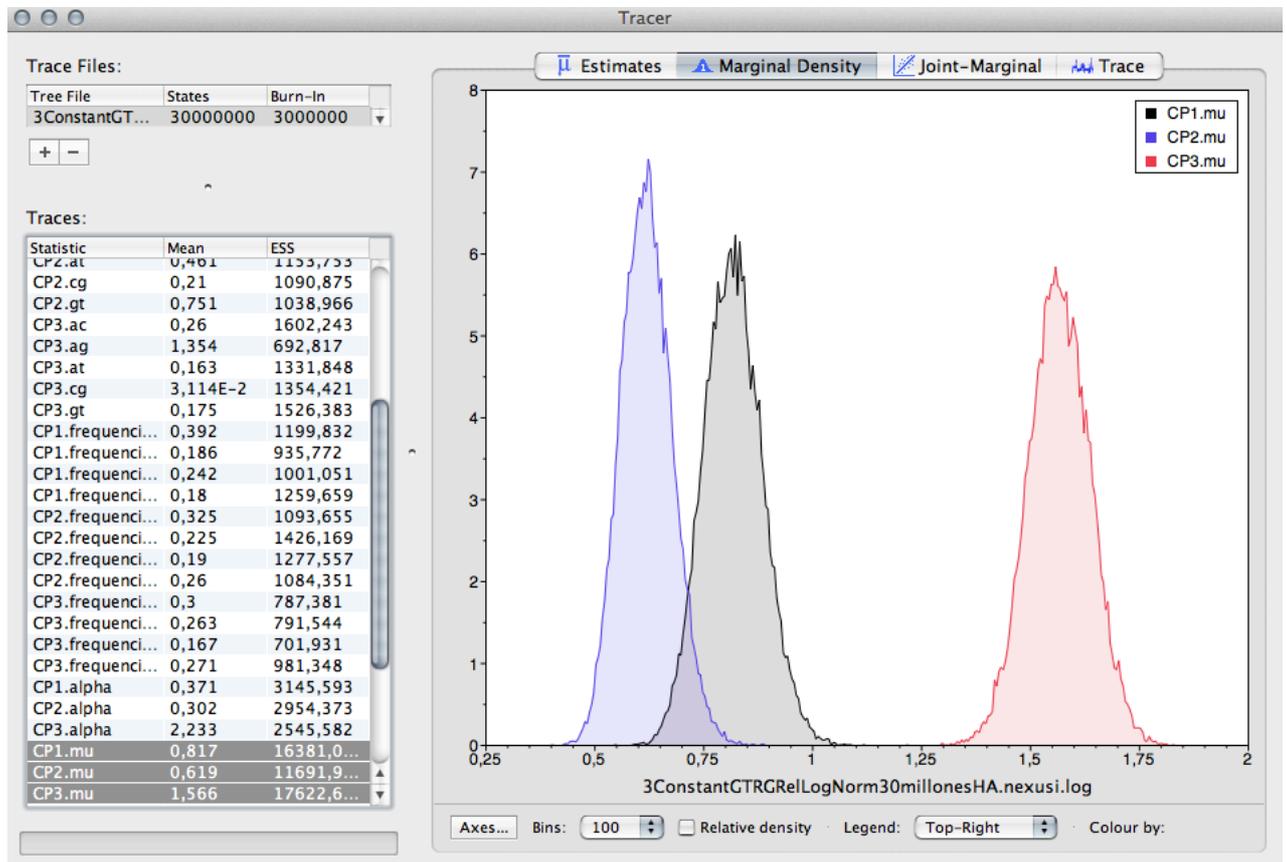


Figura 19. Representación gráfica del análisis Bayesiano de Coalescencia correspondiente al Dataset 2. Se observa las frecuencias de cambios en las diferentes posiciones del codón.

En la figura 19 se puede ver la representación gráfica del análisis Bayesiano de Coalescencia correspondiente al set de datos 2. La misma muestra la variación característica para las diferentes posiciones del codon. Se ve como la posición dos (pico azul) presenta una frecuencia de cambio (0,619) sustancialmente menor a las posiciones uno (0,817; pico negro) y tres (1,566; pico rojo), siendo esta última la que presenta la mayor frecuencia de cambio.

6. Discusión

El objetivo principal del presente trabajo fue estudiar el grado de variabilidad genética y antigénica del virus Influenza A H3N2 circulantes en nuestro país durante la temporada invernal 2011-2012 y comparar el mismo con la cepa vacunal recomendada por la OMS para nuestro hemisferio.

6.1 Puesta a punto de la amplificación de los genes HA y NA de VIA H3N2 y caracterización de las cepas de VIA circulantes en la temporada invernal 2011-2012

A fin de cumplir nuestros objetivos, se realizó en una primera instancia la puesta a punto en nuestro laboratorio de la amplificación de los segmentos génicos que codifican para las glicoproteínas de superficie HA y NA de Virus Influenza A subtipo H3N2 mediante la técnica de PCR.

Una vez puesta a punto la técnica se procedió a la identificación de las cepas de Virus Influenza A circulantes en Uruguay en la temporada invernal 2011-2012. En este marco se realizó el análisis de 10 muestras clínicas (previamente tipificadas VIA (por M2 positivo) y no H1N1 (por H1N1 negativo), ver Tabla 2) procedentes de pacientes con síntomas de Insuficiencia Respiratoria Aguda (IRA), Insuficiencia Respiratoria Aguda Grave (IRAG) y Enfermedad tipo Influenza (ETI), obteniéndose en 9 de las mismas señal positiva (Tabla 5). Los análisis filogenéticos de los segmentos génicos HA y NA, de las muestras obtenidas en el presente estudio (Figuras 11a y 11b respectivamente), muestran claramente que las mismas se agrupan junto con las cepas pertenecientes al subtipo H3 en el caso de la hemaglutinina y al subtipo N2 en el caso de la neuraminidasa. Asimismo, este estudio nos permitió confirmar el origen humano de los segmentos HA y NA de las muestras analizadas (Figuras 12a y 12b respectivamente).

6.2 Determinación de las relaciones filogenéticas entre las estirpes circulantes en Uruguay y en diferentes regiones geográficas respecto a la cepa vacunal.

A fin de profundizar en el conocimiento de las relaciones filogenéticas entre las cepas de VIA H3N2 aislados durante las temporadas invernales 2011-2012 en Uruguay, las provenientes de otras regiones geográficas y las cepas incluidas en la vacuna para la temporada invernal 2011-2012 para el hemisferio sur, las secuencias de los segmentos génicos HA y NA obtenidas de los pacientes uruguayos de los años 2011 y 2012 fueron alineadas con secuencias correspondientes a cepas de VIA H3N2 de distintas partes del mundo y la región Latinoamericana, así como también con la cepa vacunal correspondiente al hemisferio sur para la temporada 2011 y 2012 y se procedió a la realización de los estudios filogenéticos correspondientes.

Estudios relativamente recientes muestran que cepas pertenecientes a múltiples clados co-circulan durante la mayoría de las temporadas del virus Influenza en América del Sur, y ha sido evidenciado que, para la mayoría de las temporadas invernales estudiadas, las cepas vacunales y las cepas circulantes pertenecían a diferentes clados filogenéticos (Goñi y cols. 2008). Dichos resultados también concuerdan con estudios anteriores realizados por Nelson y cols. 2007 en Australia y Nueva Zelanda.

Los resultados del presente estudio muestran que las cepas recolectadas durante el periodo 2011-2012 se agrupan en un clado notoriamente alejado del clado donde se encuentra la cepa vacunal recomendada para ese mismo periodo, lo que nos estaría indicando que, las cepas vacunales para los años 2011 y 2012 y las cepas que han circulado en este mismo periodo de tiempo poseen relaciones filogenéticas distantes entre sí (ver Figuras 13 y 14). Los resultados obtenidos demuestran la necesidad de realizar estudios más exhaustivos de las cepas de virus Influenza A que circulan en la región, así como de las rutas y los mecanismos de dispersión del virus, para de alguna forma lograr reducir al mínimo el desfase existente entre las cepas circulantes de las epidemias anuales y las cepas vacunales recomendadas para dichos periodos. Estos resultados concuerdan con estudios realizados para VIA subtipo H3, en donde han

demostrado que las cepas vacunales se encontraban en clúster diferentes a las cepas circulantes, salvo durante el año 2007 (Goñi y cols. 2009).

6.3 Determinación de polimorfismos asociados a resistencia a antivirales

Resistencia a los adamantanos:

Los adamantanos como la amantadina y rimantadina, han sido usados como agentes antivirales contra VIA en los países desarrollados (Hata y cols. 2007). Los adamantanos bloquean el canal iónico (proteína M2) de VIA y por lo tanto inhiben al cambio de pH necesario para el proceso de desnudamiento viral (Wang y cols. 1993). Se ha observado un creciente aumento de la resistencia a este tipo de fármacos en los últimos años (Simonsen y cols. 2007). En la temporada 2005-2006 se observó un aumento de comunidades virales resistentes en Japón, sudeste asiático, Australia y norteamérica (Saito y cols. 2007; Barr y cols. 2007; Bright y cols. 2006). Los análisis filogenéticos han revelado que los virus resistentes provienen de un solo linaje que comparte una mutación en la posición aminoácidica 31 de la proteína M2 (S31N) (Simonsen y cols. 2007, Hata y cols. 2007). Estos análisis han demostrado que también estos virus comparten cambios aminoácidicos característicos en las posiciones 193 (S193F) y 225 (D225N) de la proteína HA (Hata y cols. 2007). El presente trabajo muestra que todas las cepas Uruguayas de VIA H3N2 correspondientes a las temporadas invernales 2011-2012 presentan los polimorfismos asociados a la resistencia a adamantanos. Como se describe en trabajos previos realizados en Uruguay, debido al hecho de que es infrecuente el uso de drogas adamantanos en los países de Sudamérica, que todos los virus resistentes pertenecen a un único linaje genético (Simonsen y cols. 2007) y que es muy poco probable que estos cambios hayan surgido por azar en los VIA circulantes en Sudamérica, se postula la posibilidad de una posible migración de estas cepas de VIA a nuestra región (Goñi y cols. 2007).

Resistencia a los inhibidores de NA

Dentro de los inhibidores de NA más administrados a los pacientes podemos encontrar oseltamivir y zanamivir. Estos se unen al sitio activo de la NA, bloqueando la función sialidasa, previniendo de esta forma la liberación de los viriones.

El sitio activo de la NA de los VIA es una estructura en forma de bolsillo compuesto de residuos finamente conservados (Colman y cols. 1983). Estos residuos forman las paredes del bolsillo, entre los cuales están los que forman el sitio catalítico propiamente dicho (R118, D151, R152, R224, E276, R292, R371, Y406) que interacciona con el sustrato, el ácido siálico, y luego encontramos los residuos (E119, R156, W178, S179, D/N198, I222, E227, H274, E277, N294, E425) que interaccionan con los residuos del sitio catalítico estabilizando el sitio activo (Colman y cols. 1993).

La presencia de cambios en el sitio activo de la NA conduce a la generación de cepas resistentes a los inhibidores de NA. Se han observado dos tipos de mutaciones asociadas a dichas cepas resistentes: mutaciones a nivel del sitio catalítico (R292K y R152K), o a nivel de la región estabilizadora del sitio activo (E119V, H274Y, N294S, D198N) (Ferraris y cols, 2008).

Este trabajo muestra que ninguna de las cepas de VIA H3N2 estudiadas en Uruguay en las temporadas invernales 2011-2012 presenta los polimorfismos asociados a la resistencia a inhibidores de neuraminidasa.

6.4 Dinámica poblacional del Virus de Influenza A H3N2 mediante abordajes bayesianos de coalescencia.

Diversos estudios indican que VIA evoluciona más rápidamente que VIB, sugiriendo además que dentro de VIA, el subtipo H3N2 presenta tasas evolutivas mayores que el subtipo H1N1 (Cox, 1993; Suzuki, 2001; Nelson, 2006; Chen y Holmes, 2008).

Estos estudios han sugerido que VIA H3N2 está evolucionando a una tasa de entre 2,68 y $12,5 \times 10^{-3}$ sustituciones por sitio por año, mientras que los Virus Influenza B evolucionan a una tasa menor del orden entre 1,14 y $3,32 \times 10^{-3}$ sustituciones por sitio por año (Nelson, 2006), (Ver Tabla 6). En contraparte el subtipo H1N1 de VIA se ha documentado que está evolucionando a una tasa del orden de $3,5 \times 10^{-3}$ sustituciones por sitio por año (Pybus, 2009) (Ver Tabla 6). Estos hechos se reflejan en la mayor cantidad de veces que se debió reformular la vacuna para el subtipo H3N2, respecto al subtipo H1N1, para el periodo comprendido entre los años 1972 y 2002. El componente vacunal H3N2 ha sido reformulado veinte veces, en cambio solo once cambios del componente Influenza B y siete del componente H1N1 fueron realizados durante el mismo período de tiempo demostrando la menor variabilidad de estos virus a lo largo del tiempo (Pumarola y cols, 2002). Esto concuerda con los resultados del presente estudio donde la tasa estimada para ambos conjuntos de datos (descriptos previamente) está en el entorno de 5×10^{-3} sust./sitio/año. Esta tasa evolutiva se relaciona con lo que se aprecia a nivel epidemiológico en la mayor frecuencia en la reformulación de la vacuna para el subtipo H3N2.

Cabe mencionar que la diferencia observada en las tasas evolutivas correspondiente a los set de datos 1 y 2 podría deberse a la diferencia en longitud de las secuencias analizadas. Asimismo, la variación encontrada entre las tasas evolutivas para ambos data set podría también deberse a que la región que abarca los 971pb del Dataset 2 sea mucho más variable a lo largo del tiempo en comparación a la secuencia completa (Dataset 1), presentando tasas evolutivas mayores que el resto de la secuencia. Se determinó que el subtipo H3N2 de VIA sigue un modelo de crecimiento poblacional constante para ambos datasets analizados.

Los cambios en el sitio 3 del codón suelen darse con mayor frecuencia que en los sitios 1 y 2 ya que raramente resulta en un cambio aminoacídico (solo el 30% de los posibles cambios). Asimismo, si un cambio ocurre en el sitio 1 del codón, la mayoría de las veces (96%) resulta en un cambio aminoacídico. Sin embargo, las sustituciones que ocurren en el sitio 2 resultan en un cambio aminoacídico en la totalidad de los casos, por lo que estos cambios son menos frecuentes (Lamey y cols, 2009). Esto concuerda con los resultados de este estudio en donde las frecuencias de cambios para las diferentes posiciones del codón son las que siguen: 52,2% para la posición tres (CP3), 20,63% para la posición 2 (CP2) y 27,23% para la posición 1 (CP1). Conceptualmente quiere decir que cambios en la posición dos son menos frecuentes (en nuestro caso 20,63%) dado que una simple sustitución deriva siempre en un cambio aminoacídico. Cambios en la posición uno del codón son poco frecuentes (27,23% en nuestro estudio) ya que la mayoría de las veces resulta en un cambio aminoacídico. Cambios en la posición tres del codón son los más frecuentes (52,2%) dado que raramente ocurren cambios aminoacídicos, (Ver Figura 19).

7. Conclusiones

- 1) Se realizó la puesta a punto de las PCR correspondientes a la amplificación de los genes HA y NA de VIA H3N2.
- 2) Mediante análisis filogenéticos se pudieron caracterizar 6 de las 10 muestras estudiadas, siendo estas VIA H3N2.
- 3) Los estudios filogenéticos muestran que la cepa incluida en la vacuna para el hemisferio sur por la OMS para los años 2011-2012 presenta diferencias filogenéticas significativas con las cepas circulantes en nuestro país para estos mismos años a nivel nucleotídico. Estos estudios demuestran ampliamente la necesidad de monitorear la variabilidad genética de las cepas que circulan en nuestro país y la región Sudamericana de forma de obtener vacunas más relacionadas y por lo tanto más efectivas.
- 4) En lo que refiere a la resistencia a antivirales, se pudo comprobar que las cepas uruguayas analizadas en este estudio presentan los polimorfismos característicos en la HA asociados a resistencia a inhibidores del canal iónico.
- 5) Por otra parte se observó que las cepas estudiadas eran sensibles a los inhibidores de neuraminidasas.
- 6) Se estimó un tamaño poblacional constante para H3N2 a lo largo de los años analizados. La tasa evolutiva estimada esta en el entorno de 5×10^{-3} sust./sitio/año. Esta tasa es superior a la estimada para otras variantes tanto de VIA H1N1 como de VIB, lo que concuerda con otros reportes. Esto nos ayuda a interpretar la epidemiología de este virus en cuanto a la mayor tendencia a reformular el componente H3N2 de la vacuna con respecto a las otras cepas incluidas en la misma.

8. Perspectivas

Como perspectiva del presente trabajo tenemos la de continuar con el estudio de VIA, analizando las poblaciones virales dentro de los diferentes reservorios mediante estudios bioinformáticos y de laboratorio, de forma de conocer más en profundidad el modo y las tasas de evolución de estos virus. Asimismo nos planteamos la realización de estudios estructurales de las proteínas que conforman los principales blancos antigénicos a fin de poder contribuir al conocimiento para el diseño de drogas antivirales.

10. Referencias Bibliográficas

- 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 branches: A fast, accurate and powerful alternative. *Syst. Biol.* **55**, 539–552.
- Barr I.G., Hurt A.C., Deed N., Iannello P., Tomasov C., Komadina N. (2007).** The emergence of adamantane resistance in influenza A (H1) viruses in Australia and regionally in 2006. *Antiviral Research* 75(2): 173–176.
- 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.
- Blackburne B, Hay A, Goldstein R. (2008).** Changing selective pressure during antigenic changes in human influenza H3. *Plos Pathog*,4:e1000058.

Bloom J, Arnold F. (2009). In the light of directed evolution: pathways of adaptative protein evolution. *Proc Natl Acad Sci USA*.101: 9205-9210.

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 RA, Shay D, Shu B, Cox N, Klimov A. (2006). Adamantane resistance among influenza A viruses isolated early during the 2005-2006 influenza season in the United States. *JAMA* 295:891-894.

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 B.J., Leser G.P., Jackson D. y Lamb R. A. (2008). The Influenza Virus M2 Protein Cytoplasmic Tail Interacts with the M1 Protein and Influences Virus Assembly at the Site of Virus Budding. *J Virol*. 82(20): 10059–10070.

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.

Chi XS, Hu A, Bolar TV, Al-Rimawi W, Zhao P, Tam JS, Rappaport R, Cheng SM (2002). Detection and characterizacion of new influenza B virus variants in 2002. *J Clin Microbiol* 43: 2345-2349.

Colman P, Hoyne P, Lawrence M. (1993). Sequence and structure alignment of paramyxovirus hemagglutinin-neuraminidase with influenza virus neuraminidase. *Virol*. 67(6): 2972–2980.

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

- Cox N, Xu X, Bender C. (1993).** Evolution of haemagglutinin in epidemic variants and selection of vaccine viruses. In: Hannoun C. Options for the control of influenza II, pp223-30. Elsevier, North Holland.
- 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.
- 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), 2605-15.
- De Jong JC, Rimmelzwan GF, Fouchier RA, Osterhaus AD. (2000).** Influenza virus: a master of metamorphosis. *Infect* 40: 428-433.
- De Visser J, Elena S. (2007).** The evolution of sex: empirical insights into the roles of epistasis and drift. *Nat Rev Genet*.8: 139-149.
- Digard P, Blok V, Inglis S. (1996).** Complex formation between influenza virus polymerase proteins expressed in *Xenopus* oocytes. *Virology* 216: 326-337.
- Donnelly, P., Tavaré, S., (1995).** Coalescents and genealogical structure under neutrality. *Annual Review of Genetics* 29, 401-421.
- Drummond, A.J. & Rambaut, A. (2007).** BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evolutionary Biology* 7, 214
- Drummond, A.J., Rambaut, A., Shapiro, B., Pybus, O.G., (2005).** Bayesian coalescent inference of past population dynamics from molecular sequences. *Mol Biol Evol*, 22, 1185-1192.
- 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.
- 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.

- Ferguson NM, Gavani AP, Bush RM (2003).** Ecological and immunological determinants of influenza evolution. *Nature* 40:218-228.
- Fernandez-Sesna A. (2007).** The Influenza virus NS1 protein: inhibitor of innate and adaptative immunity. *Infect Disord Drug Targets* 7(4): 336-343.
- Ferraris O, Lina B. (2007).** Mutations of neuraminidase implicated in neuraminidase inhibitors resistance. *J Clin Virol*.
- Finkelman B, Viboud C, Koelle K, Ferrari M, Bharti N, Grenfell B. (2007).** Global patterns in seasonal activity of influenza A/H3N2, A/H1N1, and b from 1997 to 2005: viral coexistence and latitudinal gradients. *Plos One*, e1296.
- 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 hemagglutinin subtype (H16) obtained from black-headed in mice. *J Virol* 79(5): 2814-22.
- Gamblin S, Skehel J. (2010).** Influenza hemagglutinin and neuraminidase glycoproteins. *J Biol Chem* 285(37): 28403–28409.
- 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 pathogenicity. *Trends Microbiol* 7(3): 99-100.
- Glezen W, Payne A, Snyder D., Downs T. (1982).** Mortality and Influenza. *J. Infect.Dis.* 146: 313-321.
- Gonzalez S., Ortin J. (1999).** Characterization of influenza virus PB1 protein binding to viral RNA: two separate regions of the protein contribute to the interaction domain. *J Virol* 73(1):631-637.

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.

Goñi N, Fajardo A, Moratorio G, Colina R, Cristina J. (2009). Modeling gene sequences over time in 2009 H1N1 influenza A virus populations. *Virology J*, 6: 215-222.

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.

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 (web server issue), W557–W559.

Gutierrez, Eliana Battaglia, LI, Ho Yeh, Santos, Ana Catarina De Seixas (2001). Effectiveness of influenza vaccination in elderly outpatients in São Paulo city, Brazil. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo [online].* vol. 43, no. 6.

Hak E, Buskens E, van Essen GA, de Bakker DH, Grobbee DE, Tacken 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.

Hata M, Tsuzuki M, Goto Y, Kumagai N, Harada M, Hashimoto M, Tanaka S, Sakae K, Kimura T, Minawaga H, Miyazaki Y. (2007). High frequency of amantadine-resistant influenza A (H3N2) viruses in the 2005-2006 season and rapid detection of amantadine-resistant influenza A (H3N2) viruses by MAMA-PCR. *Jpn J Infect Dis* 60, 202-204.

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

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.

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

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

Hudson, R.R., (1991). Gene genealogies and the coalescent process. *Oxford Surveys in Evolutionary Biology* 7, 1-44.

Iwatsuki-Horimoto K, Horimoto T, Noda T, Kiso M, Maeda J, Watanabe S, Muramoto Y, Fujii K, Kawaoka Y. (2006). The cytoplasmic tail of the influenza A virus M2 protein plays a role in viral assembly. *J Virol.* 80(11):5233-40.

Jeffery K, Taubenberger y John C. Kash (2010). Influenza Virus Evolution, Host Adaptation and Pandemic Formation. *Cell Host Microbe.* 7(6): 440-451.

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.

Kaplan, N.L., Darden, T., Hudson, R.R., (1988). The coalescent process in models with selection. *Genetics* 120, 819-829.

Katz JM, Naeve CW y Webster RG (1987). Host cell-mediated variation in H3N2 influenza viruses. *Virology* 156(2): 386–395.

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.

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

Keane, T.M., Creevey, C.J., Pentony, M.M., Naughton, T.J., McInerney, J.O., (2006). Assessment of methods of amino acid matrix selection and their use on empirical data shows that ad hoc assumptions for choice of matrix are not justified. *BMC Evol. Biol.* 6, 29.

Kilbourne ED, Smith C, Brett I, Pokorny BA, Johansson B, Cox N (2002). The total influenza vaccine failure of 1947 revisited: major intrasubtypic antigenic change can explain failure of vaccine in a post word war II epidemic. *Proc Natl Acad Usa* 99: 10748-10752.

Kingman, J.F.C., (2000). Origins of the coalescent 1974–1982. *Genetics* 156,1461–1463.

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

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.

Lamey P, Salemi M, Vandamme AM, (2009). *The Phylogenetic Handbook. A practical Approach to Phylogenetic Analysis and Hypothesis Testing*. 2nd ed.

Laver W, Air G, Webster RG, Markoff L. (1982). Amino acid sequence changes in antigenic variants of type A influenza virus N2 neuraminidase. *Virology* 122 :450-460.

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.

Lole, K. S., Bollinger, R. C., Paranjape, R. S., Gadkari, D., Kulkarni, S. S., Novak, N. G., Ingersoll, R., Sheppard, H. W. & Ray, S. C. (1999). Full-length human immunodeficiency virus type 1 genomes from subtype C-infected seroconverters in India, with evidence of intersubtype recombination. *J Virol* 73, 152–160.

McCown MF, Pekosz A. (2005). The influenza A virus M2 cytoplasmic tail is required for infectious virus production and efficient genome packaging. *J Virol.* 79(6):3595-605.

McCown MF, Pekosz A. (2006). Distinct domains of the influenza A virus M2 protein cytoplasmic tail mediate binding to the M1 protein and facilitate infectious virus production. *J Virol.* 80(16):8178-89.

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.
- 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.
- Nguyen-Vam-Tam JS, Hampson AW (2003).** The epidemiology and clinical impact of pandemic influenza. *Vaccine* 21: 1762-1786.
- Nelson M, Holmes E. (2007).** The evolution of epidemic influenza. *Nat Rev Genet.*8:196- 205.
- Nelson M, Simonsen L, Viboud C, Miller M, Taylor J, George K, Griesemer 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.
- Nelson M, Spiro D, Wentworth D, Beck E, Fan J, and Henrickson K. (2009).** The early diversification of influenza A/H1N1pdm. *Plos Curr Influenza* RRN1126.
- Neuhauser, C., Krone, S.M., (1997).** The genealogy of samples in models with selection. *Genetics* 145, 519–534.
- Neumann G, Brownlee GG, Fodor E, Kawaoka Y (2004).** Orthomyxovirus replication, transcription and polyadenylation. *Curr Top Microbiol Immunol* 283: 121-143.
- 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, Noda T, Kawaoka Y. (2009).** Emergence and pandemic potential of swine origin H1N1 influenza virus. *Nature* 459 (7249): 931-939.

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

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

OMS. (2009b). Pandemic (H1N1): update 76. Disponible en: http://www.who.int/csr/don/2009_11_27a/en/index.html.

Orlich M., Gottwald H., Rott R. (1994). Orthomyxoviridae: the viruses and their replication, p.1353-1395. En B.N.Fields, D.Knipe, and P.Howley (ed), *Fields virology*, 3rd ed. Lippincott Raven, PA.

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.

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.

- Pumarola T, Marcos MA y Jiménez de Anta MT (2002).** Variaciones antigénicas del virus de la influenza como determinante epidemiológico clave. *Vacunas* 2002;3(Supl 1):1-4
- Pontoriero AV, Baumeister EG, Campos AM, Savy VL, Lin YP, Hay A (2003).** Antigenic and genomic relation between human influenza viruses that circulated in Argentina in the period 1995-1999 and the corresponding vaccine components. *J Clin Virol* 28: 130-140.
- Portela A, Melero J, Martinez C, Domingo E, Ortin J. (1985).** A primer vector system that allows temperature dependent gene amplification and expression in mammalian cells: regulation of the influenza virus NS1 gene expression. *Nucleic Acids Res.* 13:7959-77.
- Pybus OG, Rambaut A. (2009).** Evolutionary analysis of the dynamics of viral infectious disease. *Nat Rev Genet.* 10(8): 540-50.
- 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 Biolog* 8: 207-215.
- Rice, S.H., (2004).** *Evolutionary Theory: Mathematical and Conceptual Foundations.* Sinauer Associates: Sunderland, MA. Chapter 3.
- Roberts PC, Lamb RA, Compans RW (1998).** The M1 and M2 proteins of influenza A virus are important determinants in filamentous particle formation. *Virol* 240(1): 127-137.
- Robertson J S, Schubert M, Lazzarini R A, (1981).** Polyadenilation site for Influenza virus ARNm. *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.

Robertson J, Naeve C, Webster R, Bootman J, Newman R, Schild G. (1985). Alterations in the haemagglutinin associated with adaptation of influenza B virus to growth in eggs. *Virology*.143:166-74.

Robertson J. (1993). Clinical influenza virus and the embryonated hens eggs. *Rev Med Virol*.3:97-106.

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. *Virol* 411(2): 229-236.

Russell C, Jones T, Barr I, Cox N, Garten R, Gregory V, Gust I, Hampson A, Hay A, Hurt A, de Jong J, Kelso A, Klimov A, Kageyama T, Komadina N, Lapedes A, Lin T, Mosterin A, Obuchi M, Odagiri T, Osterhaus A, Rimmelzwaan G, Shaw M, Skepner E, Stohr K, Tashiro M, Fouchier R, Simth D. (2008). The global circulation of seasonal influenza A (H3N2) viruses. *Science*.320: 340-346.

Saito R, Li D, Shimomura C. (2007). An off-seasonal amantadine resistant influenza AH3 viruses isolated during the 2005-2006 winter season in Nara, Japan. *Jpn Infect Dis*.60: 53-54.

Salminen M, Carr J, Burke D, McCutchan F (1995). Identification of brak-points in intergenotyping recombinants of HIV type I by bootscanning. *AIDS res Hum Retroviruses* 11: 1423-1425.

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

Sanjuan R, Cuevas J, Moya A, Elena S. (2005). Epistasis and the adaptability of an RNA virus. *Genetics* 170: 1001-1008.

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.

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

Shaw MX, Xu X, Li Y, Normand S, Ueki RT, Kunimoto GY, Hall H, Klimov A, Cox NJ, Subbarao K (2002). Reappearance and global spread of variants of influenza B/Victoria/2/87 lineage viruses in the 200-2001 and 2001-2002 seasons. *Virology* 303: 1-8.

Shinde V, Bridges C, Uyeki T. (2009). Tripe-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.

Simonsen L, Viboud C, Grenfell B, Dushoff J, Jennings L, Smit M, Macken C, Hata M, Gog J, Miller M, Holmes E.(2007a). The genesis and spread of reassortment human influenza A/H3N2 viruses conferring adamantane resistance. *Mol Biol Evol* 24:1811-1820.

Slatkin, M., (2001). Simulating genealogies of selected alleles in populations of variable size. *Genetic Research* 145, 519-534.

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, Rimmelzmann 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.

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. *Virology* 258 (1): 1-20.

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 Virology* 1:415-418.

Timothy M. Uyeki, M.D., M.P.H., M.P.P., and Nancy J. Cox, Ph.D. (2013). Global Concerns Regarding Novel Influenza A (H7N9) Virus Infection. *NEJM.*

The Phylogenetic Handbook, Second Edition, pág. 6. Cambridge University Press 2009.

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.

Tong S., Li Y., Rivaller P., Conrardy C., Castillo D., Li-Mei Chen, Recuenco S., Ellison J., Davis C., York I., Turmelle A., David Moranc, Rogers S., Shia M., Tao Y., Weil M., Tang K., Rowe L., Sammons S., Xu X., Frace M., Lindblade K., Cox N., Anderson L., Rupprecht C., and Donis R., (2012). A distinct lineage of influenza A virus from bats. *PNAS*.

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.

Wenzel J., Panning M., Kalu L., Mangold A., Revell A., Luna A., Zepeda H., Perea L., Vazquez-Perez A., Young S., Rodic-Polic B., Eickmann M., Drosten C., Jilg W., and Reischl U. (2010). Analytical Performance Determination and Clinical Validation of the Novel Roche RealTime Redy Influenza A/H1N2 Detection Set. *Journal of Clinical Microbiology* 48(9):3088-3094.

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.

Wright P, Neumann G, Kawaoka Y. Orthomyxoviruses. In Knipe DM, Howley PM (Editors). *Fields Virology*. 5th ed. Philadelphia: Lippincott–Raven Press 2007; pp. 1691–1740.

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 S, Suzuki Y, Suzuki T, Le MQ, Nidom CA, Sakai-Tagawa Y, Muramoto Y, Ito M, Kiso M, Horimoto T, Shinya K, Sawada T, Kiso M, Usui T, Murata T, Lin Y, Hay A, Haire LF, Stevens DJ, Russell RJ, Gamblin SJ, Skehel JJ, Kawaoka Y (2006). Haemagglutinin mutations responsible for the binding of H5N1 influenza A viruses to human-type receptors. *Nature* 444 (7117): 378-82

Yamashita, M., Krystal, M., Fitch, W., Palese, P. (1988). Influenza B-virus evolution: cocirculating lineages and comparison of evolutionary pattern with those of influenza A and C viruses. *Virology* 163, 112-122.

Yassine, H., Al-Natour, M., Lee, C. and Saif, Y. (2007). Interspecies and intraspecies transmission of triple reassortant H3N2 influenza A viruses. *Virology Journal*, 4:129.

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.

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.