



Universidad de la República  
Facultad de Ciencias  
Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas  
Área Biología Sub-área Biología Celular y Molecular

# Análisis evolutivo de cepas pandémicas y post pandémicas del virus Influenza A H1N1: Una mirada profunda a la dinámica poblacional de los virus RNA

Lic. Victoria Comas  
Tutor: Dr. Gonzalo Moratorio  
Co-tutor: Dr. Juan Cristina  
Montevideo, Uruguay

2015



## **Agradecimientos**

Son muchos los que me han acompañado en este camino, que no ha sido únicamente parte de mi carrera, sino más bien de mi vida. Muchos a quienes agradecer.

Comienzo por el Dr. Gonzalo Moratorio, gracias por confianza a la hora de decidir ser mi tutor de maestría. Gracias por tu apoyo desde el comienzo en el laboratorio, enseñándome a trabajar y más importante aún a pensar en ciencia. Gracias por las tantas veces que me ayudaste a encontrar la motivación para seguir adelante con mi tesis. Muchas gracias por permitirme conocer la ciencia de otras partes del mundo, experiencias que me hicieron crecer en lo profesional, así como también en lo personal. Mil gracias además por todas las recomendaciones y críticas que permitieron que se mejorara sustancialmente la escritura de este trabajo.

Quiero agradecer al Dr. Juan Cristina, jefe del Laboratorio de Virología Molecular del CIN y co-tutor de esta tesis, por abrirme las puertas de su laboratorio para realizar mi tesina de grado y posteriormente este trabajo de posgrado. Gracias por tu apoyo incondicional y confianza para poder desarrollarme libremente en su laboratorio.

Gracias a mi compañeros y amigos del LVM, MSc. Natalia Echeverría, MSc. Sabrina Fischer, MSc. Álvaro Fajardo, Lic. Patricia Núñez, Lic. Gabriela Bentancour y la Dra. Pilar Moreno. Gracias por los lindos momentos vividos dentro y fuera del laboratorio y por dedicar su tiempo y compartir su conocimiento en muchos momentos a lo largo de este camino. Gracias por hacer tan lindo el trabajo del día a día en el laboratorio.

Un agradecimiento especial al Lic. Martín Söhnora, quien fue fundamental en el procesamiento y análisis de los resultados de secuenciación masiva.

Muchas gracias a los miembros del tribunal por aceptar evaluar este trabajo.

Agradezco al Dr. Marco Vignuzzi por recibirme tan amablemente en su Laboratorio en el Instituto Pasteur de París y a todo su equipo, quienes hicieron que cada día de mi pasantía fuera como estar en casa.

Agradezco a la ANII por financiar y hacer posible la realización del proyecto de maestría y la pasantía de investigación en el exterior, mediante la Beca de Posgrado Nacional y la Beca de Movilidad tipo Capacitación.

Gracias a mis padres, quienes me enseñaron el significado de compromiso y amor por lo que uno hace y confiaron en mí desde un comienzo, y desde esa confianza me ayudaron a confiar en mi misma. Agradezco además a mis hermanos por su apoyo incondicional día a día, por siempre estar para escucharme y darme fuerzas para seguir adelante en esta carrera.

A mis amigos fuera del laboratorio, quienes han sabido entender cada una de mis ausencias y a pesar de ello siempre están ahí para alentarme a continuar en esto.

Finalmente y no me nos importante un enorme gracias a mi amor y compañero Pedro, cuya compañía ha sido fundamental en esta última etapa de la tesis. Gracias por confiar en mí, apoyarme en todo y hacerme tan feliz.

Gracias a todos!!

**Índice**

01 Resumen.....	9
02 Lista de abreviaturas .....	11
1. Introducción .....	14
1.1 Bases moleculares de la variabilidad genética de virus RNA .....	14
1.1.1 Mutación y tasas de mutación .....	15
1.1.2 Estructura poblacional-Cuasiespecies.....	20
1.1.3 Compartimentalización de cuasiespecies tejido-especifica.....	22
1.1.4 Metodologías utilizadas para el estudio de cuasiespecies.....	23
1.2 Modelo de estudio: Virus de la Influenza.....	24
1.2.1 La enfermedad .....	24
1.2.2 Epidemiología.....	25
1.2.3 Clasificación y Nomenclatura .....	25
1.2.4 Morfología y Organización molecular .....	27
1.2.5 Ciclo replicativo del virus Influenza A .....	29
1.2.6 Diversidad Antigénica.....	31
1.2.6.1 Deriva antigénica.....	31
1.2.6.2 Salto antigénico.....	31
1.2.7 Pandemias por el virus de la Influenza A .....	32
1.2.8 Prevención y control de la enfermedad.....	34
1.2.8.1 Vacunas .....	34
1.2.8.2 Terapia antiviral .....	36
1.2.8.3 Nuevos desafíos en la terapia antiviral. ....	39
2. Objetivos generales.....	41
2.1 Objetivo general Capítulo I.....	42
2.2 Objetivo general Capítulo II.....	42
2.3 Objetivo general Capítulo III.....	42

3. CAPÍTULO I: Variabilidad genética de las estirpes del Virus Influenza A H1N1pdm que circularon en nuestro país así como en la región sudamericana entre los años 2009 al 2013 ..	43
3.1 Objetivo general Capítulo I:.....	44
3.2 Materiales y Métodos Capítulo I .....	45
3.2.1 Muestras .....	45
3.2.2 Extracción de RNA .....	45
3.2.3 Retrotranscripción.....	45
3.2.4. Amplificación por PCR los genes HA y NA .....	47
3.2.5 Electroforesis en gel de agarosa y purificación de los productos de PCR .....	48
3.2.6 Secuenciación por Sanger .....	49
3.2.7 Edición y Análisis de secuencias .....	49
3.2.8 Análisis filogenéticos .....	50
3.2.9 Mapeo de sustituciones aminoacidicas. ....	50
3.2.9a. Predicción de epítopes y sitios de N-glicosilación.....	50
3.2.9b Determinación de la eficacia de la vacuna para las cepas pandémicas y post pandémicas .....	51
3.3 Resultados Capítulo I.....	52
3.3.1 Amplificación por PCR de los segmentos génicos HA y NA a partir de muestras clínicas..	52
3.3.2 Determinar la variabilidad genética de VIA que circulan en Uruguay y en la región sudamericana y la relación de estas cepas con las estirpes introducidas en las vacunas para el hemisferio sur en cada año mediante abordajes filogenéticos .....	53
3.3.3 Caracterización de las cepas uruguayas estudiando el segmento génico HA y NA .....	58
3.3.3.1 Estudio de sustituciones en el segmento génico HA .....	58
3.3.3.2 Mapéo de las sustituciones en HA .....	61
3.3.3.3 Estudio de sustituciones en el segmento génico NA .....	63
3.3.3.4 Mapéo de las sustituciones en NA .....	66
3.3.3.5 Predicción de epitopes B.....	68
3.3.3.6 Análisis de potenciales sitios de Glicosilación.....	69

---

3.3.4 Estudio de la eficacia de la vacuna seleccionada para el hemisferio sur para el año (2009-2013) .....	72
3.3.5 Determinar polimorfismos asociados a resistencia a antivirales.....	73
3.4 Discusión Capítulo I .....	75
4. Capítulo II: Análisis la dinámica poblacional de variantes virales de gripe A H1N1 entre los años 2009 al 2013 mediante secuenciación masiva .....	82
4.1 Objetivo general Capítulo II.....	83
4.2 Materiales y métodos Capítulo II .....	84
4.2.1 Cuantificación del DNA purificado .....	84
4.2.3 Construcción de librerías:.....	85
4.2.3.1 Fragmentación y purificación de DNA por cuentas magnéticas (magnetic beads) .....	85
4.2.3.2 Cuantificación y control de calidad y tamaño de las librerías.....	85
4.2.4 Secuenciación Masiva .....	85
4.2.5 Obtención de secuencias y análisis .....	86
4.3 Resultados Capítulo II.....	88
4.3.1 Primera caracterización de variantes virales de VIA H1N1pdm mediante secuenciación masiva. ....	88
4.3.1.1 Construcción de librerías y secuenciación por síntesis .....	88
4.3.1.2 Análisis bioinformáticos: Validación de Reads.....	88
4.3.2 Identificación de variantes minoritarias. ....	88
4.3.3 Reconstrucción de secuencias consenso .....	90
4.3.3.1 Identificación de cambios sinónimos y no sinónimos comparando con la cepa vacunal90	
4.3.4 Detección de variantes asociadas a resistencia a los antivirales. ....	94
4.4 Discusión Capítulo II .....	95
5. Capítulo III: Estudio de cuasiespecies aisladas de infecciones in vivo mediante secuenciación masiva.....	98
5.1 Objetivo Capítulo III.....	99
5.2 Materiales y métodos Capítulo III .....	100
5.2.1 Obtención de partículas virales.....	100

---

5.2.1.1 Infección en células HeLa .....	101
5.2.1.2 Titulación del virus .....	101
5.2.2 Infección in vivo.....	102
5.2.3 Evaluación de la eficiencia de infección.....	103
5.2.4 Estudio de la diversidad poblacional por secuenciación masiva .....	104
5.3 Resultados Capítulo III.....	105
5.3.1 Producción de stock virales.....	105
5.3.2 Infección <i>in vivo</i> y evaluación de la eficiencia de infección .....	107
5.3.3 Estudio de la diversidad poblacional por secuenciación masiva .....	109
5.4 Discusión Capítulo III .....	111
6. Conclusiones.....	114
7. Referencias Bibliográficas .....	117
8. Anexo.....	125
8.1 Anexo 1-Capítulo I.....	126
8.2 Anexo 2-Capítulo II .....	135
8.3 Anexo 3-Publicaciones derivadas de esta tesis.....	139
8.4 Anexo 4-Publicaciones realizadas durante el desarrollo de esta tesis.....	140

## **01 Resumen**

La infección causada por el virus influenza A provoca una enfermedad aguda y recurrente con graves consecuencias sobre la salud pública mundial, causando 250 a 500 mil muertes al año. En humanos estos virus presentan dos patrones epidemiológicos: como epidemias estacionales u ocasionales pandemias. Al igual que la mayoría de los virus cuyo genoma está compuesto por RNA, estos virus presentan elevadas tasas de mutación y por lo tanto circulan como complejas poblaciones constituidas por múltiples variantes, denominadas cuasiespecies. En abril del año 2009 un nuevo virus Influenza A H1N1 ganó lugar en la población humana, iniciando la primera pandemia del siglo XXI. El fin de la pandemia tuvo lugar en agosto del año 2010 y desde entonces, el virus Influenza A H1N1 pandémico (H1N1pdm), ha circulado como un virus estacional junto los virus de Influenza A/H3N2 y dos linajes virus Influenza B, causando epidemias anuales durante los meses de invierno.

La mayor parte de la morbi-mortalidad causada por los virus de la influenza A puede ser evitada por la vacunación anual; sin embargo, dicha medida no está asociada a una completa protección, en parte debido a la continua evolución de la estructura antigénica del virus. La frecuente generación de nuevas variantes antigénicas ha determinado que la vigilancia sea un objetivo de salud pública prioritario a escala mundial. Por otro lado, los antivirales juegan un rol importante en la profilaxis y el tratamiento de ésta enfermedad. Dado que los virus pandémicos son naturalmente resistentes a los Adamantanos, los Inhibidores de Neuraminidasa (NAIs) se han convertido en la principal clase de droga utilizada en los últimos años. En consecuencia, el aumento en el uso de esta droga ha llevado a la selección de mutantes resistentes, con una prevalencia actual del 1-2% en diferentes países.

Por lo mencionado, el principal objetivo de esta tesis es realizar una caracterización molecular de los virus Influenza A H1N1pdm que circularon en nuestra región geográfica, entre los años 2009 y 2013, de forma de detectar: mutaciones involucradas en el aumento de la virulencia, resistencia a drogas antivirales, así como también nuevas variantes antigénicas.

Mediante distintos abordajes filogenéticos utilizando el segmento génico HA y NA, se pudo identificar los grupos filogenéticos circulantes en Uruguay y la región sudamericana, así como el aumento en la distancia genética entre las cepas circulantes y la cepa vacunal recomendada para el hemisferio sur. Identificamos además, un aumento en las sustituciones localizadas en sitios antigénicos en ambas proteínas desde el año 2009 al 2013 y una disminución en la eficacia teórica de la vacuna.

A pesar del aumento en la frecuencia de cepas resistentes en países de la región, no detectamos a nivel de secuencia consenso mutaciones relacionadas a resistencia en las cepas uruguayas. Sin embargo, la secuenciación masiva de estas cepas permitió detectar variantes minoritarias con diferentes sustituciones relacionadas a resistencia

a los NAIs, así como también la emergencia de variantes en altas frecuencias en el año 2013. La secuenciación masiva aportó información relevante en relación a la dinámica poblacional en los diferentes virus en los diferentes años de estudio.

Estos resultados contribuyen al entendimiento en lo que respecta a la evolución genética y antigénica de las poblaciones virales circulantes en Uruguay y la región sudamericana, siendo este tipo de estudios esencial para la planificación de nuevas respuestas efectivas para el control de esta enfermedad, así como también para el diseño de nuevas vacunas para el hemisferio sur y terapias antivirales.

Finalmente, decidí cambiar mi enfoque evolutivo a un modelo in vivo para realizar un primer abordaje al estudio de cuasiespecies aisladas de infecciones in vivo, de forma de estudiar la dinámica de variantes minoritarias en la compartimentalización durante el transcurso de una infección.

## **02 Lista de abreviaturas**

**°C:** Grados Celsius

**µg:** Microgramo

**µL:** Microlitro

**µM:** Micromolar

**Å:** Angstrom

**ADAR:** Adenosina deaminasa RNA dependiente

**Cap:** Nucleótido modificado de guaniana (7 metil-guanosina)

**CDC:** Centros para el Control y Prevención de Enfermedades

**cDNA:** DNA copia

**CO<sub>2</sub>:** Dióxido de carbono

**CVB3:** Virus Coxsakie B3

**DMEM:** Dulbecco's Modified Eagle Medium

**DNA:** Ácido Desoxirribonucleico

**dNTPs:** Desoxinucleótidos-5´trifosfato

**DTT:** Dithiothreitol

**D.P.I:** Días post infección

**E.coli:** Escherichia coli

**EDTA:** Acido etilenaminotetra acético

**EPOC:** Enfermedad pulmonar obstructiva crónica

**ETI:** Enfermedad tipo Influenza

**G:** Gavage (infección oral)

**GISRS:** Sistema de respuesta y vigilancia global de Influenza

**HA:** Hemaglutinina

**H.P.I:** Horas post infección

**Hs:** Horas

**INF:** Interferón

**IP:** Intraperitoneal

**IRA:** Insuficiencia respiratoria aguda

**IRAG:** Insuficiencia respiratoria aguda grave

**Kb:** Kilo bases

**M:** Molar

**M1:** Proteína de Matriz

**M2:** Proteína Canal Iónico

**Mf:** Millifaradio

**MgCl<sub>2</sub>:** Cloruro de Magnesio II

**ml:** Mililitros

**mM:** Milimolar

**MOI:** Multiplicidad de infección

**NA:** Neuraminidasa

**NAC:** Neumonía aguda comunitaria

**NaHCO<sub>3</sub>:** Bicarbonato de sodio

**NAI:** Inhibidor de NA

**NaOH:** Hidróxido de Sodio

**NCBI:** Centro Nacional para la Información Biotecnológica

**NEP/NS2:** Proteína de exportación nuclear o proteína no estructural 2

**NeuAc:** Ácido N-Acetylneuraminico (ácido siálico)

**ng:** Nanogramos

**NGS:** Next-generation sequencing

**nm:** Nanómetros

**NP:** Nucleoproteína

**NS1:** Proteína no estructural 1

**NS2:** Proteína no estructural 2

**OMS:** Organización Mundial de la Salud

**ORF:** Marco abierto de lectura

**P0:** Progenie cero

**P1:** progenie uno

**PA:** Polimerasa ácida

**Pb:** Pares de bases

**PB1:** Polimerasa básica 1

**PB2:** Polimerasa básica 2

**PCR:** Reacción en cadena de la Polimerasa

**pdm:** Pandémico

**PFU:** Unidades formadoras de placa

**p.i:** Post infección

**PM:** Peso molecular

**PV:** Virus de la poliomelitis

**qRT-PCR:** RT-PCR cuantitativa

**RNA:** Ácido Ribonucleico

**RNAc:** Copia complementaria de los RNAv

**RNAm:** RNA mensajero

**RNAas:** Ribonucleasas

**RNAv:** RNA viral

**RNPv:** Ribonucleoproteínas virales

**rpm:** Revoluciones por minuto

**RpRd:** RNA polimerasa RNA dependiente

**RT-PCR:** Retrotranscripción y PCR

**S/D:** Sin dato

**S/P:** Estreptomicina/Penicilina

**SFB:** Suero fetal bovino

**TAE:** Buffer Tris-Acetato-EDTA

**TCID50:** Titulación por dosis de infección 50%

**Tm:** Temperatura de melting

**U:** Unidad enzimática

**UV:** Ultra-Violeta

**V:** Voltios

**VFA:** Virus de la fiebre aftosa

**VIA:** Virus Influenza A

**VIB:** Virus Influenza B

**VIC:** Virus Influenza C

**VSV:** Virus de la estomatitis vesicular

**ViVan:** Viral Variance Analysis

# **1. Introducción**

### **1.1 Bases moleculares de la variabilidad genética de virus RNA**

Los virus cuyo genoma está constituido por RNA son los más abundantes y exitosos del planeta. Éstos son capaces de infectar tanto hospederos procariontes (bacterias y arqueas) como eucariotas, constituyendo más del 70% de los patógenos que infectan organismos superiores. Esto es debido, en gran medida, a que los virus RNA explotan todos los mecanismos de variabilidad genética que incluyen tanto la mutación, la recombinación como el reordenamiento génico [1]. Asimismo, la mutación puntual representa la principal fuente de variabilidad genética, en la cual la selección natural, la deriva y el flujo génico jugarán su rol modelando la estructura poblacional. Las mutaciones ocurren de forma aleatoria en cada ciclo de replicación y son de particular importancia en los virus RNA [2]. Este importante mecanismo conlleva numerosas implicancias biológicas, por lo que es considerado como el principal fenómeno de generación de variabilidad en el cual se centra esta tesis.

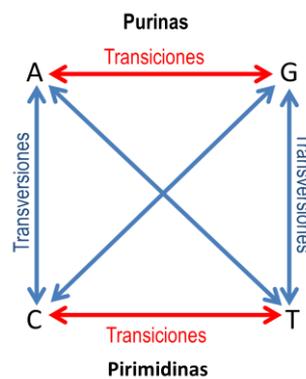
Por otro lado, la recombinación genética consiste en la formación de una nueva combinación de material genético a partir de dos parentales diferentes o entre distintos sitios del mismo genoma. A pesar de que inicialmente se creía que los virus RNA experimentaban una limitada tasa de recombinación, ambos abordajes tanto experimentales como *in silico* han revelado no sólo que la recombinación ocurre en numerosos grupos de virus RNA, sino que además la misma se presenta con mayor frecuencia de la esperada. Dentro de los diferentes mecanismos de recombinación, el más comúnmente observado en virus RNA es el denominado copy-choice o intercambio de molde. Este requiere cierta homología entre las secuencias a recombinar, y a su vez, ocurre durante la etapa de replicación [3]. La recombinación es una importante fuente de variabilidad genética, especialmente en virus RNA de polaridad positiva [4]. Su valor evolutivo se asocia a dos propiedades: (i) provee a los virus RNA de un mecanismo para contrarrestar la desventaja asociada a las altas tasas de mutación [5] y (ii) permite explorar nuevas combinaciones genéticas procedentes de virus parentales de origen distinto [6]. A diferencia de los virus RNA de polaridad positiva (Picornaviridae y Coronaviridae), donde la recombinación ocurre a una alta frecuencia, hasta ahora no se ha podido medir la frecuencia de recombinación para los virus Influenza. Sin embargo, se han encontrado ejemplos naturales de recombinación de RNA cuando en el sitio de clivaje de HA1/HA2 de la Hemaglutinina se encontró una inserción de nucleótidos derivada del RNA ribosomal 28S del hospedero o nucleótidos derivados del gen NP [7].

Finalmente, el reordenamiento génico ocurre únicamente en virus con genomas segmentados siendo una alternativa adicional de variación genética y fenotípica dada por la combinación de segmentos génicos. Este tipo de eventos son mecanismos importantes para la producción de nuevos genomas con ventajas selectivas [8]. Los

virus Influenza pueden formar reordenantes *in vivo* únicamente entre miembros del mismo tipo, siendo este mecanismo el verdadero causante de la aparición de los diferentes subtipos virales y de las pandemias a lo largo de la historia. Tanto la recombinación como el reordenamiento requieren de la co-infección de la célula por dos o más virus [9].

### **1.1.1 Mutación y tasas de mutación**

Las mutaciones genéticas hacen referencia a todos aquellos cambios heredables que alteran o modifican la secuencia nucleotídica de un organismo. Las mutaciones puntuales o sustituciones son el tipo de mutación más simple ya que implican el cambio de un único nucleótido. Hay dos tipos de sustituciones, las transiciones que implican el cambio de una purina (adenina/guanina) por otra purina y de una pirimidina (citosina/timina) por otra pirimidina, y las transversiones que son cambios de purina por una pirimidina y viceversa, ver figura 1.



**Figura 1. Diagrama representativo de los diferentes tipos de sustituciones.** Transversiones vs transiciones. Las A (Adenina) y G (Guanina) son purinas, mientras que las letras C (Citosina) y T (Timina) son pirimidinas.

Dos parámetros que nos ayudan a comprender el impacto de la mutación sobre la evolución viral son las tasas de mutación y de sustitución nucleotídica. Las tasas de mutación, definidas como el “número de cambios genéticos (mutaciones puntuales o sustituciones, inserciones, deleciones) incorporadas por ronda de replicación nos dan una idea de la predisposición de un organismo a evolucionar. Una vez generada la modificación genética, sobre ella actuarán las fuerzas evolutivas, como la selección natural y la deriva genética, para definir cuáles de estas mutaciones se fijarán y cuáles no. Aquellos cambios que se fijen serán considerados para definir las tasas de sustitución nucleotídica (número de mutaciones que se fijan por sitio por unidad de tiempo, en general años) [2]. Por tanto, las tasas de sustitución nos darán la idea de que tan rápido puede un organismo evolucionar.

Las tasas de mutación de los virus varían en el orden de  $10^{-3}$  a  $10^{-9}$  mutaciones por sitio por ronda de replicación. Para los virus RNA las tasas de mutación están en el orden de

$10^{-3}$  a  $10^5$ , mientras que para los virus DNA las tasas se ubican en el orden de  $10^{-8}$ , al igual que en el caso de bacterias y eucariotas inferiores [2], ver figura 2. Dado que los genomas de virus RNA tienen un tamaño de entre 3kb y 32kb, se espera que ocurran entre 0,1 y 1 mutaciones por genoma por ronda de replicación [10].

Varios factores determinan e influyen en los valores de las tasas de mutación. Estos pueden ser clasificados en factores propios del virus (actividad de la RNA polimerasas, tamaño y polaridad del genoma, modo de replicación), factores intrínsecos del hospedero (patrones de expresión génica) o factores ambientales (mutágenos) [11].

Dentro de los factores virales, uno de los más importantes es la arquitectura genómica. La naturaleza genómica, DNA o RNA, determinará qué tipo de polimerasa se empleará para la replicación. Así, los virus RNA utilizan RNA polimerasas dependientes de RNA (RdRp), que carecen de actividad correctora de errores. Estas enzimas carecen de actividad correctora de errores 3' exonucleasa influyendo sobre la fidelidad de copia y el número de errores introducidos en cada ciclo de replicación [12-15]. Dentro del gran grupo que constituyen los virus RNA, solamente se ha descrito hasta la fecha la presencia de la actividad 3' exonucleasa en la familia *Coronaviridae* [16]. Este mecanismo puede explicarse dado que los genomas de estos virus son los de mayor tamaño dentro de todo el universo conocido de virus con genomas de RNA. Los retrovirus emplean polimerasas que presentan fidelidad intermedia, y los virus DNA emplean polimerasas propias o celulares que presentan actividad correctora de errores, incorporando menos errores por ciclo de replicación.

Además, el tamaño y el carácter mono hebra (ss) o doble hebra (ds) del genoma viral, son determinantes. Los virus RNA y los virus DNAs presentan tasas de mutación más elevadas. Se ha postulado que existe una correlación negativa entre el tamaño del genoma y la ocurrencia de mutaciones, es decir, los virus con genoma más pequeños tienden a acumular mayor número de mutaciones en tiempos más cortos. Por lo tanto, dada una misma tasa de mutación, los genomas de menor tamaño sufrirían más rápido mutagénesis letal que los virus con un genoma mayor. Esto es, acumularían una cantidad de mutaciones que al pasar cierto umbral, llevarían a la extinción del virus, siendo este umbral menor para virus con tamaño de genoma menor.

Por otro lado, la polaridad del genoma podría influir de manera directa sobre la tasa de mutaciones. En el caso de los virus de polaridad positiva, el RNA genómico se encuentra desnudo y tiende a formar estructuras secundarias que pueden causar la pausa de la polimerasa favoreciendo la inserción o delección de nucleótidos. De esta forma se pueden generar cambios en el marco de lectura. Por el contrario, los virus de polaridad negativa están protegidos por nucleoproteínas, disminuyendo así la posibilidad de daño [2].

El modo de replicación viral es el otro factor intrínseco a considerar. Durante la replicación se sintetizan RNA intermediarios (antigenomas) que se emplean como

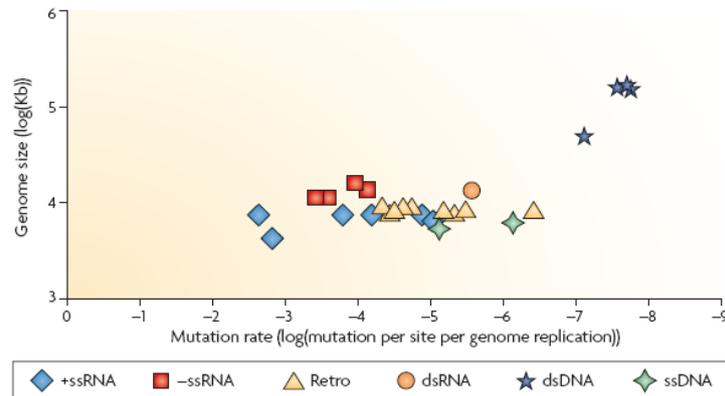
molde para la producción de nuevos genomas. Se ha postulado que el número de genomas que se utilizan para la producción de antígenomas influye en la tasa de mutación. La forma en que se acumulan las mutaciones –lineal o geométrica- está determinada por el mecanismo de replicación utilizado: “sellado”(stamping machine) cuando la partícula viral que inició la infección dará lugar a toda la progenie, y “replicación genómica geométrica” cuando los genomas de la progenie se convierten en molde para una siguiente ronda de replicación [17]. La velocidad de replicación (estrechamente relacionada al modo de replicación empleado) será también determinante en la introducción de errores, ya que a mayor velocidad aumenta la tasa de mutación [18].

Con respecto a los factores propios del hospedero, las tasas de error pueden depender del hospedero que aloja al virus. La polimerasa del virus del mosaico de pepino (CMV) exhibe diferencias en su fidelidad entre plantas de morrón y de tabaco [19].

La expresión de distintos genes celulares también puede afectar las tasas de error virales, en especial la expresión de genes de familias de enzimas oxidativas, metilasas o deaminasas que pueden introducir nuevos errores. Por ejemplo, las APOBEC3 citidina deaminasas provocan hipermutación [20], y la adenosina deaminasa RNA dependiente (ADAR) también provoca hipermutación en varios virus RNA como los rhabdovirus [21].

Finalmente, los factores ambientales que afectan las tasas de error en virus están vinculados al metabolismo celular. Por ejemplo, las especies reactivas del oxígeno (ROS) derivadas del etanol pueden dañar el RNA de virus como el de la hepatitis C, mientras que otras moléculas como el glutatión o agentes quelantes generan el efecto contrario [22].

Centrándonos ahora en las tasas de sustitución nucleotídica, encontramos que para virus con genoma RNA se han registrado valores de tasas de sustitución del orden de  $10^{-2}$  a  $10^{-5}$  sustituciones nucleotídicas por sitio por año. En el caso de los virus Influenza A evolucionan rápidamente con una alta tasa de sustitución que va desde  $1 \times 10^{-3}$  a  $8 \times 10^{-3}$  sustituciones por sitio por año [23]. Las tasas de sustitución nucleotídica se ven influenciadas evidentemente por las tasas de error subyacentes, pero existen otros factores que las afectan. Los factores virales abarcan los tiempos de generación, los tamaños poblacionales y el fitness viral [2]. En términos generales, se ha observado que a tiempos generacionales menores, mayores son las tasas de sustitución nucleotídica. La forma de transmisión del virus también puede ser importante, ya que se ha observado en muchos casos que una transmisión directa genera tasas elevadas, mientras que la transmisión a través de vectores provoca tasas de sustitución nucleotídica más bajas [2].



**Figura 2. Tasas de mutación en distintos tipos virales.** Tasas de mutación espontáneas en virus con distinta organización genómica ajustada por la tasa de replicación. Tomado de de Duffy et al, 2008.

Las altas tasas de error de los virus RNA, sus cortos tiempos de replicación y los altos tamaños poblacionales, junto con la acción de la selección natural, componen un sistema darwiniano extremo, en el que la velocidad con la que se generan nuevas variantes supera la velocidad a la que estas se fijan. Ésta dinámica de mutación-selección rápida en virus RNA conlleva necesariamente a la coexistencia de múltiples variantes en una población, que constituye un conjunto de individuos muy relacionados entre sí, pero no idénticos. A esta estructura poblacional se la conoce como cuasiespecies virales [24-26].

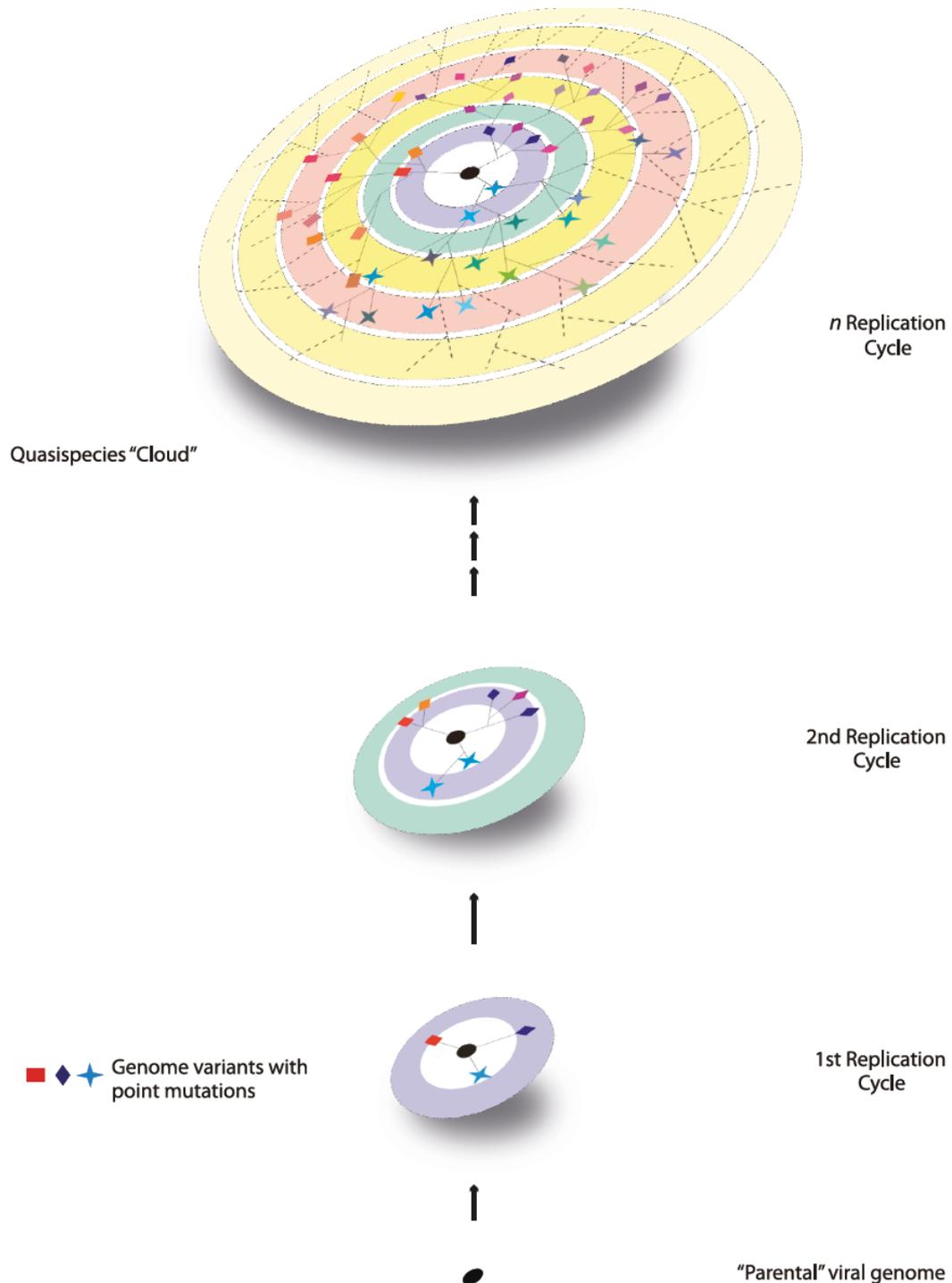
### **1.1.2 Estructura poblacional-Cuasiespecies.**

La existencia de una estructura poblacional en forma de cuasiespecies supuso la confirmación experimental de la teoría previamente desarrollada por Manfred Eigen y Peter Schuster sobre el origen de la vida y evolución molecular de replicones primitivos, donde postulaban que a partir de una copia maestra de una molécula se producían distintos mutantes con distintas probabilidades en cada ciclo de replicación. Dicha teoría define las cuasiespecies como una distribución estacionaria de mutantes organizadas en torno a una secuencia maestra dominante, estableciendo la existencia de un umbral de error como condición necesaria para la conservación de la información genética en sistemas replicativos con altas tasas de mutación [27-29].

Las primeras demostraciones de la organización en cuasiespecies de virus RNA fueron la del fago Q $\beta$ , la del virus de la fiebre aftosa (VFA) [24] y la del virus de la estomatitis vesicular (VSV) [30]. Actualmente la teoría de cuasiespecies analiza las consecuencias de la replicación propensa a error de los virus RNA y su importancia en la evolución del genoma viral [31]. Hasta el momento, los virus RNA examinados a nivel poblacional muestran un complejo espectro de mutantes y evolucionan tal como predice la dinámica de cuasiespecies [32].

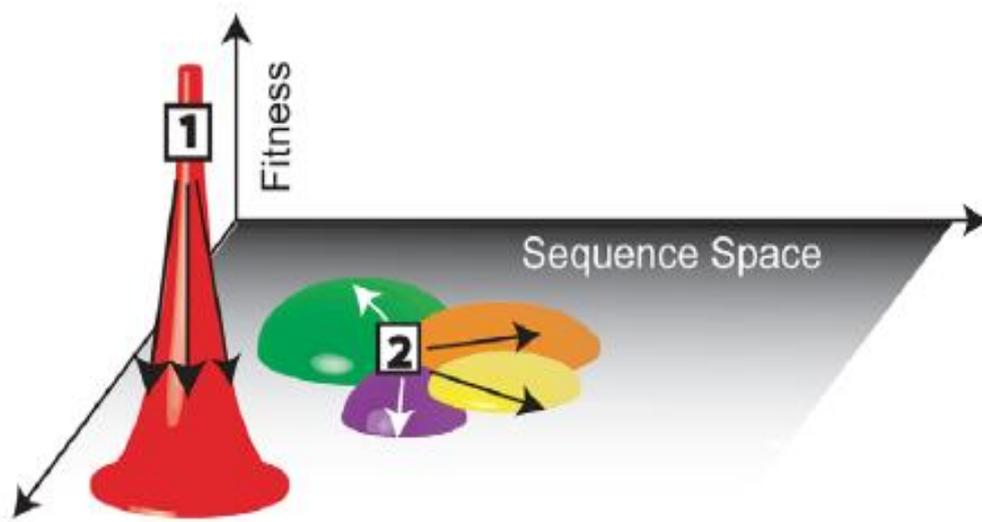
La organización genética de las poblaciones se representa utilizando el concepto de espacio de secuencia, una representación gráfica, donde la distancia física refleja

distancia genética. Dado un genoma viral que experimenta un ciclo de replicación, se generará una gran progenie que difiere en su posición. Conforme aumentan los ciclos de replicación van generando una distribución de mutantes más compleja, estando las variantes de la población más alejadas en el espacio de secuencia, ver figura 3.



**Figura 3. Representación esquemática de la generación de variantes genéticas a partir de un único genoma.** Los círculos concéntricos representan distintos ciclos de replicación, mientras que las distancias genéticas entre dos variantes se representan por líneas proporcionales a la divergencia. Adaptado de Echeverría et al. 2015.

El paisaje adaptativo o *fitness landscape* es un concepto que representa cómo diferentes genotipos se ubican en el espacio de secuencia y permite visualizar como dicha localización corresponde a un fenotipo (en virología fitness), siendo el valor de fitness de un virus su grado de adaptación al entorno [31, 33-35]. Como se observa en la figura 4 en el *fitness landscape*, el nivel basal está representado por todas las variantes del espacio de secuencia y la altura en cada región presenta el fitness de cada variante en particular. El ambiente (hospedero) y, las presiones selectivas determinan los límites de este paisaje correspondiente a cada genotipo, y la adaptación a ciertos ambientes involucra un movimiento en el espacio de secuencia (mutación) [31, 36, 37].



**Figura 4. Representación del fitness landscape de un virus RNA.** El espacio de secuencia, en el eje horizontal, corresponde a todos los genotipos que pueden encontrarse en la población. En el eje vertical se representa el fitness de cada uno de los genotipos. El diagrama 1 corresponde a un genotipo con poca diversidad genética con un fitness elevado, mientras que en el diagrama 2, se representa una población con mayor diversidad, ocupando una región mayor en el espacio de secuencia pero con menor fitness. Extraído de Lauring et al, 2010.

La estructura de una población replicándose en un ambiente establecido se caracteriza por un pico dentro del *fitness landscape*, que representa a la secuencia consenso rodeada por variantes de baja frecuencia. Las secuencias consenso representan la composición promedio del nucleótidos más común en cada posición del genoma y que puede no existir como tal dentro de la población que definen. El aumento o disminución en la frecuencia de ciertas variantes, genera una nueva distribución en el espectro de mutantes. Este hecho puede generar o no una nueva secuencia consenso [32]. Por lo tanto, las secuencias consenso representan las posiciones nucleotídicas predominantes en cada posición del genoma. Esta secuencia puede existir o no como

tal dentro de la población y puede modificarse por eventos estocásticos (deriva génica) o selectivos a nivel poblacional. Sin embargo, una secuencia consenso invariable no implica la ausencia de mutaciones en la población [32], ya que ésta no es informativa sobre la nube de variantes subyacente [37]

La generación continua de variantes constituye un mecanismo evolutivo que proporciona a los virus la capacidad de subsistir en un medio continuamente cambiante o frente a presiones selectivas, como por ejemplo la evasión de la respuesta inmune, modificación del tropismo celular, incremento del fitness en ciertos tipos celulares, evasión de agentes antivirales, entre otros [35, 38].

La importancia del espectro de mutantes fue demostrada en un estudio con mutantes del virus de la poliomielitis (PV). Esta investigación aportó evidencia directa sobre cómo la diversidad de la población de cuasiespecies define cambios en la patogenicidad viral y que la colonización exitosa de un ecosistema (tejido/Hospedero) ocurre por la cooperación de variantes del espacio de secuencia (complementación), siendo todo el espectro de mutantes el objeto de selección, y no las variantes individuales [39].

Finalmente estos resultados establecen una relación directa entre la tasa de mutación, la complejidad del espectro de mutantes y la patogenicidad viral *in vivo*.

El virus de la Influenza es un excelente modelo para estudiar estos procesos entre especies no relacionadas, ya que como se mencionó anteriormente involucra una gran cantidad de especies. La población inicial debe generar al menos un mutante que sea capaz de interactuar con el nuevo hospedero. Una vez que éste alcance el nuevo hospedero deben ocurrir cambios adaptativos como el uso de nuevos receptores celulares. Finalmente, y tal vez lo más difícil, es lograr que el virus sea capaz de evolucionar y transmitirse entre los miembros de la nueva especie una vez que el salto inter-específico haya ocurrido.

### **1.1.3 Compartimentalización de cuasiespecies tejido-específica**

La diversidad y organización de las variantes dentro de la cuasiespecie puede estudiarse a nivel de un hospedero y/o a nivel intra-hospedero, seleccionando distintos tejidos de un mismo hospedero. El término compartimentalización tejido-específica fue originado a través de estudios realizados con el virus de la hepatitis C. Navas y colaboradores mostraron la existencia de subpoblaciones con distinta composición genética en células de sangre periférica, hígado y linfocitos [40]. Los diferentes patrones de compartimentalización pueden explicarse por diferencias en la susceptibilidad genética del hospedero, presencia de barreras anatómicas y tasas de replicación viral y mutaciones diferenciales. La compartimentalización puede involucrar eventos de deriva génica y efectos fundadores y/o ser consecuencia de presiones selectivas. Una subpoblación puede presentar un fitness elevado en un

tejido y una disminución del mismo en otro tejido. La diversidad poblacional y la compartimentalización están íntimamente relacionadas ya que la cooperación de variantes genéticamente diversas puede favorecer a la colonización de nuevos tejidos [39, 40].

#### **1.1.4 Metodologías utilizadas para el estudio de cuasiespecies**

Si bien el método de secuenciación de Sanger es muy utilizado para estudios de identificación viral y análisis filogenéticos, el mismo presenta poca resolución para estudios poblacionales ya que se basa en una única lectura de la secuencia y es capaz de detectar variantes para cada posición nucleotídica únicamente si están presentes en elevadas frecuencias (30- 40%). Por lo tanto, las secuencias consenso identifican las posiciones nucleotídicas predominantes dentro de una población, pero no son completamente informativas sobre la nube de variantes subyacente [37]. Por consiguiente, el método de secuenciación de Sanger no permite determinar las secuencias nucleotídicas de una molécula de RNA genómico, sino de una multitud de genomas que definen la secuencia consenso [41].

Con el fin de aumentar la sensibilidad en la caracterización de poblaciones virales, en una primera instancia se empleó la clonación de productos de PCR y posterior secuenciación de Sanger. La secuenciación de clones individuales permite analizar con mayor resolución la heterogeneidad poblacional, ya que cada clon representa a una única variante genética [42]. Además la utilización de enzimas de alta fidelidad, las cuales presentan una fidelidad de copia dos órdenes de magnitud mayor que las *taq* polimerasas convencionales disminuyen los errores de la reacción de PCR, que podrían ser interpretados como cambios nucleotídicos en las variantes de la población [42, 43].

El advenimiento de los últimos años de plataformas de secuenciación de última generación (NGS, del inglés next generation sequencing), como Roche's GS FLX y Illumina's Genome Analyzer, han permitido la detección con gran profundidad de variantes minoritarias dentro de una muestra y además han permitido grandes avances en el análisis de la diversidad a nivel poblacional. Las tecnologías basadas en NGS proporcionan un altísimo rendimiento y gran cantidad de datos, generando miles de *reads* (secuencias de aproximadamente 100 nts) para cada posición secuenciada y de este modo generándo una cobertura ultra profunda de varias decenas de miles de *reads* promedio por nucleótido analizado [42].

## **1.2 Modelo de estudio: Virus de la Influenza**

### **1.2.1 La enfermedad**

En base a lo que establece la Organización Mundial de la Salud, la Influenza A o gripe es una enfermedad viral altamente contagiosa que afecta las células del epitelio respiratorio desde las vías aéreas superiores hasta los alveolos.

La enfermedad se caracteriza por la aparición súbita de fiebre alta, dolores musculares, cefalea, malestar general, tos seca, dolor de garganta y rinitis. La sintomatología suele aparecer 48 horas luego de efectuado el contagio. Generalmente el periodo de incubación es de uno a cuatro días, pero esto depende de la carga viral y del estado inmunológico del hospedero, presentando altas concentraciones virales en las secreciones respiratorias durante la fase inicial de la enfermedad [7]. Esta enfermedad puede presentarse de forma leve o incluso de forma asintomática, principalmente en adultos jóvenes saludables. Sin embargo, en algunos casos puede generar complicaciones más graves terminando en neumonías, e incluso puede llevar a la muerte, particularmente en personas mayores de 65 años, mujeres embarazadas, niños menores de 2 años y personas con ciertas enfermedades crónicas, metabólicas o inmunodeprimidos [44].

La recuperación de los individuos infectados involucra tanto la respuesta inmune humoral como celular. La respuesta humoral está principalmente enfocada a las glicoproteínas de superficie del virus, también definidos como los principales determinantes antigénicos: la Hemaglutinina (HA) y la Neuraminidasa (NA). Los anticuerpos neutralizantes principales son los anti-HA, los cuales se dirigen principalmente a 5 regiones denominados epítopes de la HA. Sin embargo, la rápida evolución y adquisición de nuevos cambios a nivel aminoacídico llevan a una disminución en el efecto protector de estos anticuerpos. Los anticuerpos anti-NA se producen en menor título y su efecto protector se basa en limitar la difusión del virus al aparato respiratorio, bloqueando la liberación viral tras el ciclo replicativo. La respuesta inmune celular juega un rol importante en la patogénesis viral, teniendo como blanco de acción proteínas como la Nucleoproteína (NP) o la proteína de matriz (M1), apareciendo a los días 6 a 14 y desapareciendo al día 21. Los virus de la Influenza son sensibles a las propiedades antivirales del interferón (INF), siendo éste detectado durante la fase aguda de la infección en las secreciones del tracto respiratorio [7].

### **1.2.2 Epidemiología**

A diferencia de los virus de Influenza B y C, los cuales están restringidos a humanos, los virus de Influenza A poseen una ecología más compleja con un amplio rango de hospedero que involucra diferentes especies aviares y mamíferas, siendo las aves acuáticas su reservorio natural. En las aves acuáticas, el virus de la Influenza muestra una mínima evolución generando infecciones asintomáticas. Sin embargo, una vez que el virus se transmite a otras especies puede evolucionar rápidamente y causar epidemias y pandemias en aves de corral, mamíferos inferiores y humanos [45]. Entre humanos, los virus de Influenza se transmiten por gotas de aerosoles liberadas al toser, estornudar, hablar o exhalar. También es posible la transmisión por vías indirectas, esto es, por contacto con objetos contaminados.

Los virus de Influenza tienen una distribución mundial y causan epidemias de diferente intensidad a lo largo del año. La enfermedad alcanza su pico de mayor prevalencia en regiones de clima templado durante los meses de invierno. Cada año existen dos temporadas de gripe ya que el hemisferio sur y el hemisferio norte alcanza esta estación en distinto momento, mientras que en las regiones tropicales la temporada de gripe se desarrolla durante todo el año. Los brotes anuales de Influenza afectan entre el 5 y 15% de la población mundial, resultando en 3 a 5 millones de casos severos. Se ha estimado una tasa de mortalidad anual de 250.000 a 500.000 casos en todo el mundo, siendo la principal causa de muerte respiratoria en humanos, y estas cifras pueden incrementarse drásticamente en años de pandemia [46].

Una de las características más relevantes de las epidemias provocadas por el virus de la Influenza es su rápida aparición y diseminación.

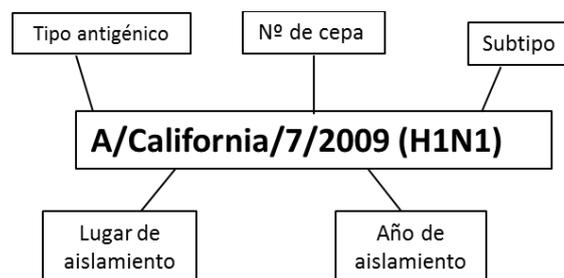
Además de la gran trascendencia en lo que respecta a salud pública debido a su gran capacidad de diseminación, alta morbilidad y repercusión sobre la mortalidad, esta enfermedad genera un gran impacto socioeconómico. Éste último incluye costos directos, relacionados al sistema sanitario, como gastos de medicamentos y hospitalizaciones, así como costos indirectos relacionados a las consecuencias del absentismo laboral o escolar y la reducción en el sistema productivo. Un estudio reciente estima que en los Estados Unidos los costos directos anuales superan los 3 billones de dólares y los indirectos rondan entre 10 y 15 billones de dólares [44].

### 1.2.3 Clasificación y Nomenclatura

El agente etiológico de esta enfermedad es el virus de la Influenza A, el cual forma parte de la familia *Orthomyxoviridae*. Esta familia viral está compuesta por tres géneros de virus Influenza: virus Influenza A (VIA), virus de la Influenza B (VIB), virus de la Influenza C (VIC) [7]. Los tres géneros de virus Influenza difieren en su rango de hospedero así como en su patogenicidad.

Los virus Influenza A son los más importantes ya que es el responsable de epidemias anuales y pandemias. Éstos, a su vez, están divididos en múltiples subtipos como resultado de la combinación de dos proteínas virales, Hemaglutinina (HA) y Neuraminidasa (NA). En la naturaleza se han reportado dieciocho genes que codifican la proteína HA y once genes que codifican la proteína NA. Todos los subtipos de HA y NA se han encontrado en aves acuáticas, excepto los subtipos recientemente descritos H17N10 y H18N11, los cuales fueron recientemente descritos en murciélagos [47]. A lo largo de la historia solo tres subtipos de HA (H1, H2 y H3) y dos de NA (N1 y N2) han sido capaces de causar pandemias en humanos (H1N1, H2N2, and H3N2). Sin embargo, han ocurrido transmisiones inter-específicas de virus aviares a humanos involucrando distintas HA (H5, H6, H7, H9 y H10) sin lograr una buena transmisión humano-humano [48, 49].

Los virus de Influenza se denominan a través de un acrónimo, en el que se incluye en primer lugar el tipo de virus (A, B o C) y en el caso que no sea una cepa de origen humano se debe de incluir su hospedero. Posteriormente se escribe el origen geográfico, el número asignado y el año de aislamiento. Finalmente y entre paréntesis se indica el subtipo viral [7], ver figura 5.

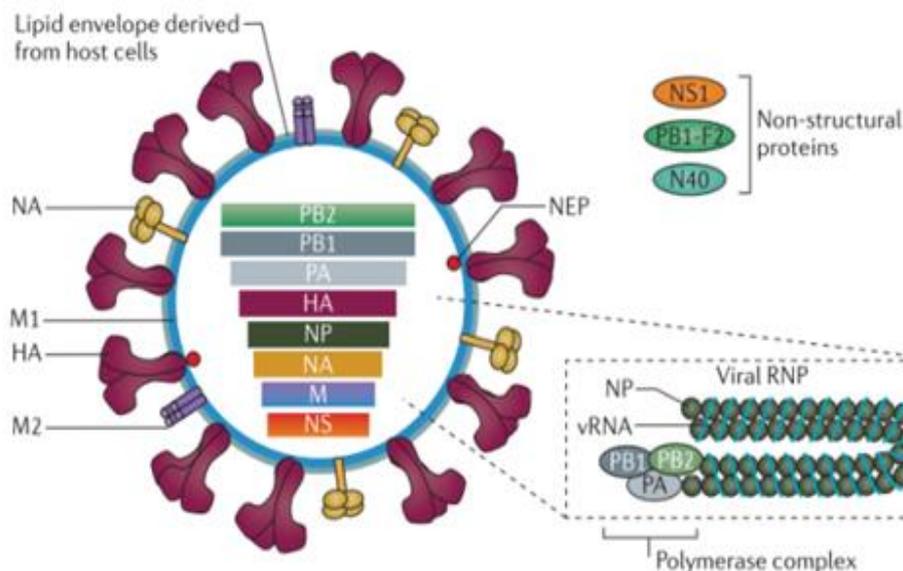


**Figura 5. Nomenclatura de los virus Influenza.**

### 1.2.4 Morfología y Organización Molecular

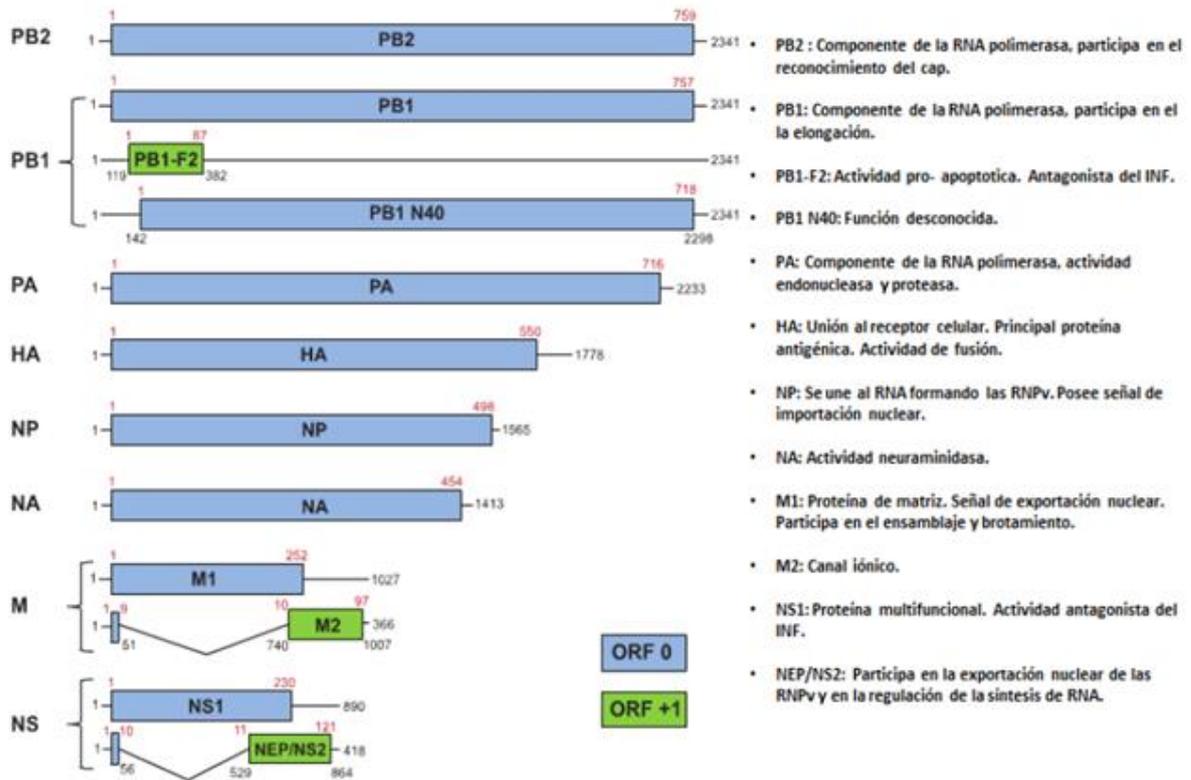
Los virus Influenza son virus envueltos y pleiomórficos de 80-120nm. Se caracterizan por poseer un genoma de RNA simple hebra de polaridad negativa segmentado de 13.6 Kb. La envoltura viral consiste en una bicapa lipídica obtenida de la célula hospedera en la cual están insertas tres proteínas virales, la HA, la NA y una tercera proteína, la proteína de canal iónico (M2).

La proteína HA es una glicoproteína integral de membrana tipo I, la cual se une al receptor celular en la célula hospedera. La proteína NA es una glicoproteína integral de membrana tipo II con actividad sialidasa. La proteína M2 forma un canal iónico entre el interior viral y el medio. Asimismo, la HA, NA y M2 poseen distinto grado de agregación. Mientras HA se encuentra formando homotrimeros, la proteína NA y M2 forma homotetrameros [50]. Por debajo de la envoltura se encuentra la proteína de matriz (M1), la cual establece conexiones entre la envoltura viral y el *core* interno. El genoma viral está compuesto de ocho segmentos de RNA simple hebra de polaridad negativa (RNAv). Cada uno de los segmentos génicos está asociado a nucleoproteínas (NP) y al complejo de polimerasas virales, Polimerasa básica 1 (PB1), Polimerasa básica 2 (PB2) y Polimerasa ácida (PA). Por otra parte, también se encuentran en el virión proteínas no estructurales como la proteína no estructural 1 (NS1), proteína no estructural 2 (NS2) o proteína de exportación nuclear (NEP), la proteína N40 y PB1-F2 [7, 51], ver figura 6.



**Figura 6. Diagrama esquemático de la estructura del virus de la Influenza A.** Se observan las proteínas integrales de membrana (HA, NA y M2). Por debajo se aprecia la proteína de matriz (M1) y los ocho segmentos génicos de RNA rodeadas de las nucleoproteínas (NP) y asociados al complejo de RNA polimerasas (PB1, PB2 y PA). Extraído y adaptado de Medina y García-Sastre, 2011.

Con un genoma de menos de 14 kb, estos virus han desarrollado distintas estrategias para expandir la capacidad codificante de su genoma. Entre ellas se incluyen el corte/empalme de RNA (*splicing*) y la generación de RNAm bicistrónicos. En el caso de VIA, los ocho segmentos de RNAv son capaces de codificar doce proteínas, ya que el segmento génico M y el NS codifican dos proteínas por *splicing* alternativo y en el caso del segmento génico PB2 codifica PB1 N40 y PB1-F2, mediante corrimiento del marco de lectura, ver figura 7 [7].



**Figura 7. Organización genómica del virus Influenza A y sus proteínas codificantes.** En la figura se muestran los ocho segmentos génicos los cuales codifican para doce proteínas (PB2, PB1, PB1-F2, PB1 N40, PA, HA, NA, NP, M1, M2, NS1 y NS2). Si bien la mayoría de los segmentos génicos codifican una única proteína, algunos generan más de una proteína por mecanismos de corte y empalme alternativo o corrimiento de marco de lectura. Extraído y adaptado de Palese y Shaw, 2011.

### **1.2.5 Ciclo replicativo del virus Influenza A**

Los virus son agentes biológicos que carecen de un metabolismo propio y dependen necesariamente de una célula para su replicación. A continuación se describe brevemente el ciclo replicativo para el caso del virus de la Influenza, ver figura 8.

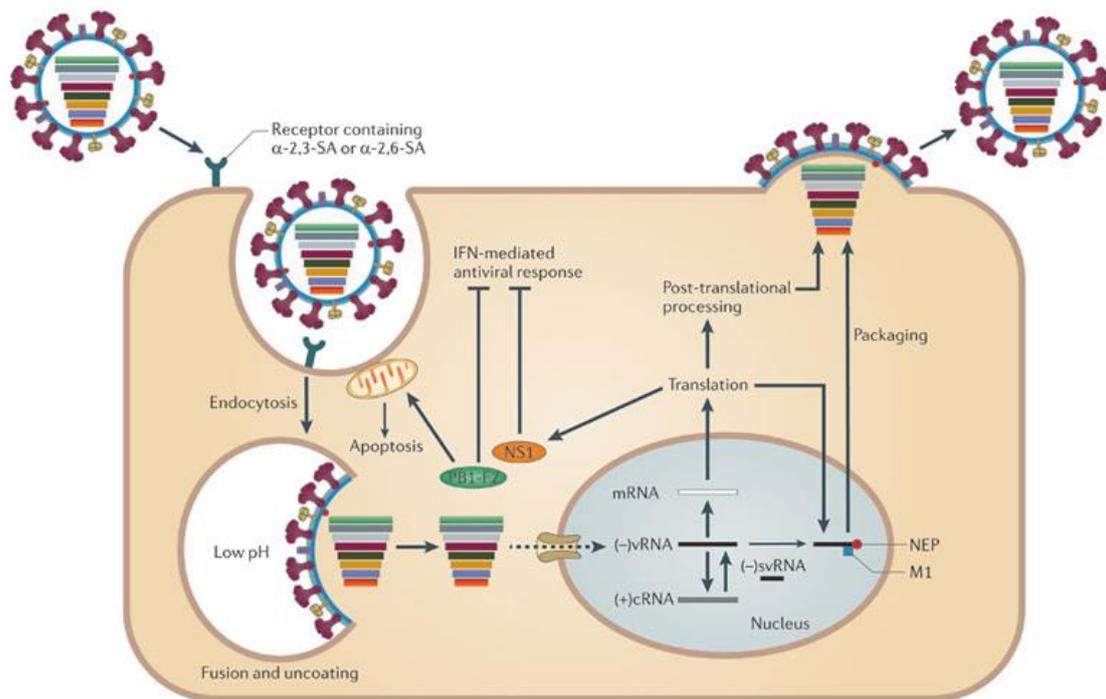
El primer paso para la multiplicación viral es la unión del virus al receptor de la célula hospedera. En el caso de virus Influenza que infectan humanos estos se unen al receptor celular, ácido siálico (NeuAc), con terminaciones  $\alpha(2.6)$ . La penetración del virus a la célula se produce por mecanismos de endocitosis mediada por receptor. El bajo pH dentro de la vesícula causa alteraciones en la conformación de la proteína HA, exponiendo un extremo hidrofóbico de la subunidad HA2. Este cambio hace posible la fusión de la membrana endosomal con la membrana plasmática, permitiendo posteriormente la liberación de las RNPv al citoplasma celular.

El descenso del pH dentro de la vesícula también activa la proteína de canal iónico M2 y por lo tanto al flujo de protones al interior de la partícula viral. Este flujo de cargas positivas desestabiliza las interacciones entre las RNPv y las proteínas de matriz M1, permitiendo de este modo su liberación al citoplasma [7].

A diferencia de la mayoría de los virus con genoma RNA, en el caso de Influenza los segmentos de RNAv son transportados desde el citoplasma al núcleo, ya que todos los segmentos de RNAv deben obtener el 5'cap para sintetizar sus propios RNA mensajeros (RNAm) y algunos requieren de la maquinaria de corte/empalme (splicing). Durante la generación de los RNAm virales, los segmentos de RNAv de polaridad negativa son copiados por el complejo de polimerasas virales a RNA de polaridad positiva. Dicho proceso se requiere un mecanismo denominado *cap-snatching* o secuestro de cap, mediante el cual el complejo de polimerasas virales corta los RNAm celulares y los utilizan como primers para el inicio de la polimerización. Los RNAm virales generados son exportados desde el núcleo al citoplasma y son traducidos por un mecanismo cap-dependiente. La mayoría de los RNAm virales son traducidos por ribosomas libres en el citoplasma. Sin embargo, aquellos RNAm que codifican las proteínas HA, NA y M2 son traducidas por ribosomas asociadas al retículo endoplásmico, pasando por el retículo y el aparato de Golgi donde sufren modificaciones post-traduccionales y finalmente son insertadas en la membrana citoplasmática de la célula hospedera [7].

El aumento en la cantidad de proteína NP generada a lo largo del ciclo se cree que está asociada al cese de la transcripción y el comienzo de la síntesis de genomas virales y por ende al cambio conformacional en el complejo de polimerasas. La replicación ocurre en dos pasos en el núcleo de la célula hospedera: primero se sintetiza una molécula de RNA copia (RNAc) de polaridad positiva y luego este intermediario se utiliza como molde para la generación de segmentos de RNAv de polaridad negativa (genomas virales). Luego se forman los nuevos complejos de RNPv y son exportados al

citoplasma siendo las proteínas M1 y NEP/NS2 esenciales en este momento. Una vez en el citoplasma se dirigen a la membrana plasmática de la célula hospedera donde ocurre el proceso de ensamblaje y brotamiento de las nuevas partículas virales. Estas partículas virales poseen glicoproteínas que contienen ácido siálico como parte de su estructura de carbohidratos y por lo tanto sufren auto-aglutinación por las HAs. A este nivel actúa la proteína NA, cuya función es la remoción de esas interacciones por su capacidad sialidasa, permitiendo finalmente la liberación de las nuevas partículas virales [7, 51, 52].



**Figura 8. Diagrama representativo del ciclo del virus Influenza A.** El virus Influenza A que infecta humanos reconoce receptores a nivel de la superficie celular unidos al ácido siálico (SA) por un enlace  $\alpha$  2.6. Una vez unido el virus a la superficie celular este es internalizado por endocitosis y la acidificación del endosoma permite en última instancia la liberación de las RNPv al citoplasma. Estas son transportadas al núcleo, donde ocurre la transcripción y la replicación formando nuevas RNPv que serán dirigidas hacia la membrana plasmática donde se ensamblan, brotan y finalmente son liberadas. Extraído y adaptado de Medina y García-Sastre, 2011.

### **1.2.6 Diversidad Antigénica**

Los virus Influenza sufren variaciones antigénicas importantes. Sus dos glicoproteínas de superficie, la HA y la NA, sufren dos tipos de variaciones antigénicas: la deriva antigénica y el salto antigénico. Estos cambios en la antigenicidad viral son la estrategia adoptada por los virus Influenza para continuar circulando en la población humana, y también hacen que su comportamiento sea impredecible.

#### **1.2.6.1 Deriva antigénica**

La estructura de HA del virus Influenza ha sido cristalizada y se ha podido determinar 5 sitios antigénicos Sa, Sb, Cb, Ca1, y Ca2 en el dominio HA1 el cual forma parte de la cabeza globular de la proteína.

Los cambios antigénicos o deriva antigénica, ocurren por acumulación de una serie de mutaciones puntuales que resultan en la sustitución de aminoácidos en los distintos sitios antigénicos. Estas sustituciones previenen la unión de los anticuerpos inducidos por infecciones previas, y como consecuencia los virus pueden infectar al hospedero. Este mecanismo, denominado deriva antigénica, es el responsable de la generación de las epidemias anuales de Influenza. La frecuente generación de variantes antigénicas de VIA ha determinado que la vigilancia de estos virus sea un objetivo de salud pública prioritario a escala mundial, ya que compromete además la eficiencia de vacuna [53-55].

#### **1.2.6.2 Salto antigénico**

Los saltos antigénicos involucran cambios antigénicos mayores en las glicoproteínas de superficie, resultando en el reemplazamiento de un segmento génico codificante. Como se mencionó anteriormente, una peculiaridad del genoma del virus Influenza es su distribución en diferentes segmentos génicos. Esta característica permite que los virus puedan intercambiar o reordenar segmentos completos con otras variantes virales y generar nuevas entidades cuando las distintas variantes co-infectan una misma célula. Algunos de estos virus tendrán la capacidad de infectar humanos y en ocasiones mediante eventos mutagénicos podrán adaptarse a ser transmitidos directamente entre ellos. Esto, lejos de ser un evento raro, ocurre con frecuencia en la naturaleza y es tal vez la principal fuerza evolutiva de los virus Influenza A [56]. El reordenamiento génico ha sido el verdadero causante de la aparición de los diferentes subtipos virales a lo largo de la historia de los virus Influenza en humanos y animales. Cuando el reordenamiento involucra los segmentos génicos codificantes para HA y NA se habla de un salto antigénico y se da la emergencia de un nuevo subtipo viral genéticamente diferente. Este proceso ha sido asociado a la generación de cepas pandémicas que ha sufrido la humanidad [57-60].

### **1.2.7 Pandemias por el virus de la Influenza A**

A lo largo de la historia han ocurrido diversas pandemias. La primera pandemia del siglo XX ocurrió en 1918 y fue conocida como “gripe española”. Esta pandemia fue causada por un virus H1N1 de origen aviar y se estima que causó más de 50 millones de muertes. Las subsecuentes pandemias fueron más leves. En 1957 ocurrió la pandemia conocida como gripe asiática, donde la cepa H1N1 que circulaba fue remplazada por una cepa de H2N2 y en este caso el número total de víctimas fue estimado en 1.5 millones. Posteriormente, en 1968 ocurrió la pandemia conocida como gripe de Hong Kong. Dicha pandemia fue causada por un nuevo virus de origen aviar subtipo H3N2, con 1 millón de casos de muertes. Para el año 1957 el subtipo H1N1 dejó de circular en humanos y volvió a emerger en 1977. A partir de ese momento los virus H1N1 y H3N2 co-circularon hasta que en abril del 2009 un nuevo virus, lejanamente relacionada con la cepa H1N1 que circulaba, ganó lugar en la población humana. La emergencia de este nuevo virus inició la primera pandemia del siglo XXI (H1N1 pdm) [49, 61, 62]. Los primeros casos reportados tuvieron lugar en México y Estados Unidos, y rápidamente el virus se diseminó a nivel global. Para el mes de junio alrededor de 30.000 casos habían sido reportados en 74 países y fue en ese momento que la Organización Mundial de la Salud (OMS) declaró alerta por pandemia en fase seis.

La nueva cepa H1N1pdm se caracterizó por ser una enfermedad respiratoria febril auto limitada, con signos y síntomas similares a los de la Influenza estacional como fiebre, tos y dolor de garganta. Otros síntomas no típicos de una Influenza estacional que se manifestaron fueron vómitos y diarrea. La tasa de mortalidad y morbilidad fueron significativamente diferentes en los distintos grupos etarios. La población más afectada fueron los niños y adultos jóvenes y la mayor tasa de hospitalización fue para niños de hasta 5 años. En contraposición a lo que ocurre con cepas de Influenza estacionales, la población menos afectada fueron las personas mayores de 65 años, sugiriendo para este grupo etario una inmunidad parcial contra este virus, la cual fue posteriormente comprobada en algunos casos. Asimismo se demostró una gran similaridad estructural y antigénica con la cepa que causó la pandemia en 1918, generando protección cruzada en estudios *in vivo* [63, 64]. Es interesante notar que pese a lo anterior, este grupo etario experimentó una gran tasa de muerte. Si bien los casos más severos se dieron en pacientes menores de 5 años, la mayoría de los casos fatales tuvieron lugar en pacientes de entre 5 y 59 años. La obesidad severa o mórbida, diabetes, enfermedades cardiovasculares y posibles efectos inmunológicos adversos fueron los que contribuyeron a los casos fatales por H1N1pdm [63].

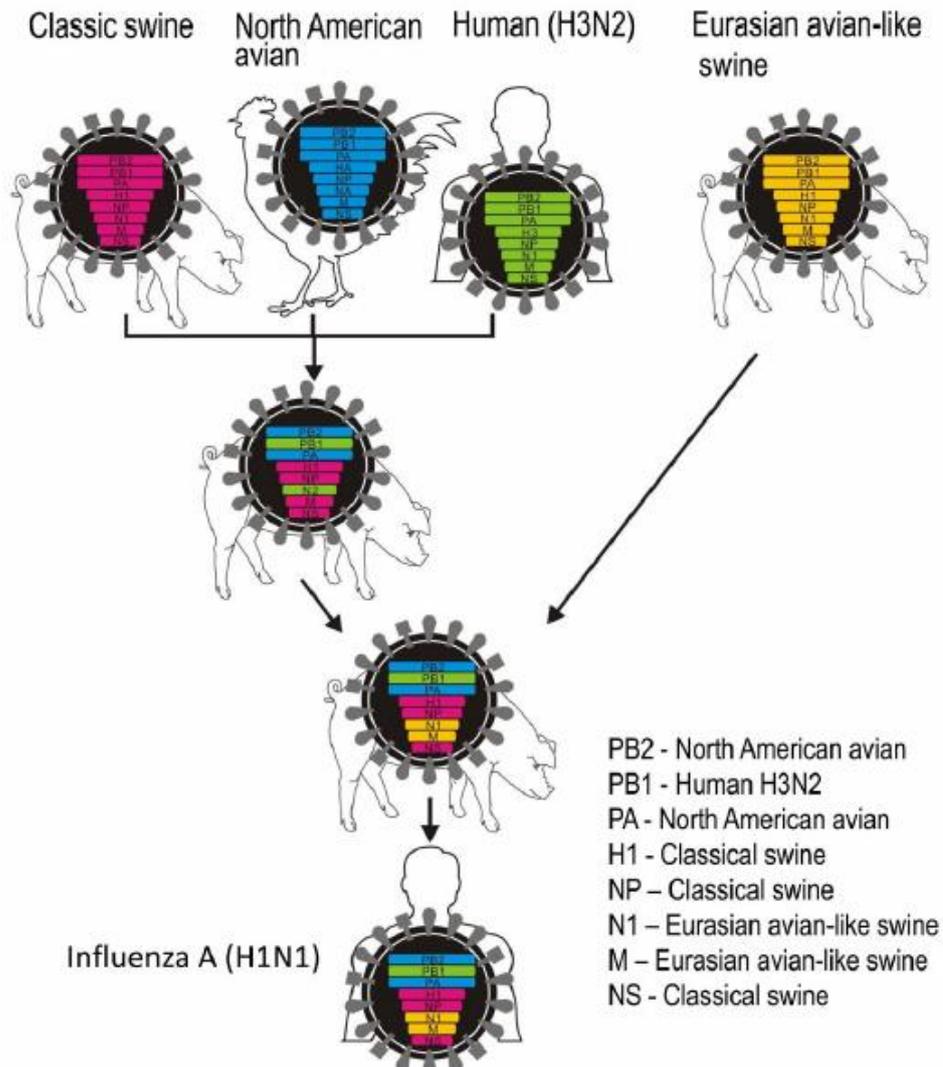
El centro de control y prevención de enfermedades (CDC) estimó para los Estados Unidos un total de 61 millones de infectados de los cuales 274.000 necesitaron ser

hospitalizados, así como también 12.470 casos de muerte entre abril del 2009 y abril del 2010. En términos de severidad, la cepa H1N1pdm fue mucho más leve que otras cepas pandémicas teniendo en cuenta además que durante los años no pandémicos ocurren alrededor de 30.000 muertes relacionadas a Influenza en los Estados Unidos. La OMS declaró el fin de la pandemia el 10 de agosto del año 2010 y hasta la fecha, a nivel global se estimó un total de 100.000 muertes a causa de esta cepa pandémica. La ausencia de marcadores de virulencia en el gen PB2 (ausencia de residuo de lisina en la posición 627), la ausencia de funcionalidad de la proteína PB1-F2, y la ausencia del dominio PDZ en la proteína NS1, en parte explican la baja patogenicidad que tuvo el virus H1N1pdm comparado con el de 1918 [49, 51].

El origen porcino del nuevo virus pandémico y la historia evolutiva de cada uno de los segmentos génicos, fue revelado por un grupo de investigación conformado por más de 340 científicos de todo el mundo. En base al análisis filogenéticos del genoma viral se demostró que el nuevo virus fue generado a partir de un reordenamiento entre un virus de origen suino que circulaba en la población de cerdos de Norteamérica (previamente generado por un reordenamiento triple entre virus de origen humano, aviar y suino) y un virus de origen suino tipo aviar Euroasiático. Los segmentos génicos NA y M provenían de los virus de Eurasia y el resto de los virus suinos de Norteamérica, los cuales se habían generado previamente por un reordenamiento triple entre virus humanos, aviares y suinos [61, 65], ver figura 9.

Con respecto a la dinámica filogenética de los virus Influenza A H1N1pdm, estudios previos mostraron una temprana diversificación de éste virus en 7 clados que circularon en el periodo pandémico (Gr 1, Gr 2-pdm al Gr 7-pdm), basados en mutaciones específicas en el genoma viral [66, 67]. Luego del periodo pandémico ocurrió una nueva diversificación de este virus, definiéndose nuevos grupos filogenéticos, basados en mutaciones encontradas en el segmento génico HA (Gr 2 al Gr 7).

La última pandemia proporcionó información muy valiosa sobre el carácter imprevisible que adopta un modelo viral tan cambiante como el virus de la Influenza, ya que la comunidad científica estaba a la espera de una inminente emergencia de una cepa pandémica H5N1 de origen aviar. Por otro lado evidenció el rol del reservorio suino en la ecología de este virus y la necesidad de su vigilancia contante. Además esta pandemia demostró la incapacidad de la industria para generar suficientes vacunas a tiempo para proteger a la población susceptible, a pesar de la rápida respuesta de la OMS [63].



**Figura 9. Generación de los virus de Influenza A H1N1 de la pandemia del 2009.** A fines de los años 90 ocurrió un reordenamiento triple entre cepas humanas A/H3N2, cepas aviarias de Norteamérica y cepas de cerdos clásicas. Esta cepa reordenante circula en la población de cerdos hasta la actualidad. Uno de estos virus triples reordenante fue capaz de reordenar en cerdos con una cepa de cerdos de Eurasia. Esta circuló en cerdos hasta ser capaz de transmitirse y mantenerse en la población humana. Extraído de Neumann et al, 2009.

## **1.2.8 Prevención y control de la enfermedad**

### **1.2.8.1 Vacunas**

La forma más efectiva de reducir la morbi-mortalidad causada por el virus Influenza es a través de la implementación de programas de vacunación anual dirigidos principalmente a los grupos de riesgo. A diferencia de lo que ocurre con otras enfermedades que pueden ser prevenidas con esta medida, en el caso de Influenza, la misma no se asocia con una completa protección. La endemidad mundial del virus, persistencia de sus reservorios animales y su capacidad de rápida evolución, convierten a este virus en un blanco inapropiado para su erradicación. Sin embargo, durante los últimos 50 años han estado disponibles vacunas contra la enfermedad gracias a la existencia de una red de vigilancia epidemiológica, establecida por la OMS, conocida como sistema de respuesta y vigilancia global de Influenza (GISRS).

La OMS dedica cada año importantes recursos para sustentar la vigilancia en 120 centros de referencia en todo el mundo, los cuales hacen recomendaciones del contenido vacunal para cada hemisferio a través de análisis antigénicos, de secuencias y de susceptibilidad, basados en los niveles de anticuerpos en sueros humanos [49].

La recomendación de la OMS en relación a la vacuna de Influenza para el hemisferio sur es trivalente y está compuesta por dos cepas de Influenza A Influenza (H1N1 y H3N2) y una cepa de Influenza B, debido a que estos tipos virales son los principales que circulan a nivel mundial. Para el año 2010, 2011 y 2012 la vacuna estaba compuesta por, A/California/7/2009 (H1N1), A/Perth/16/2009 (H3N2), y B/Brisbane/60/2008. Para el año 2013, se realizaron modificaciones en el contenido vacunal en la cepa de Influenza A H3N2 y para la cepa de Influenza B. El contenido vacunal para ese año fue A/California/7/2009 (H1N1) pdm09, A/Victoria/361/2011 (H3N2), y B/Wisconsin/1/2010. Este tipo de vacuna tiene como objetivo inducir la producción de anticuerpos neutralizantes específicos capaces de reconocer determinantes antigénicos en la región globular de moléculas de HA.

Se ha observado que generalmente las vacunas tanto en niños como en adultos presentan tasas de efectividad de entre un 70 a un 90%. Estudios realizados en Estados Unidos demuestran que los adultos mayores son el grupo etario menos afectado por la vacuna, mostrando una eficacia promedio aproximada del 30 a 50% a los 65 años y del 15 a 30 % en mayores de 70 años [68]. Sin embargo, se ha reportado que la vacunación en personas mayores de 65 años reduce la mortalidad causada por complicaciones asociadas al virus en un 50% [69].

La eficacia de cualquier vacuna contra la gripe (tanto A como B) depende de cuán estrechamente relacionadas estén las cepas de la vacuna con las cepas en circulación.

En referencia a esto, nuestro grupo de investigación ha realizado varios estudios evidenciando 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 [70].
- b) Estudios realizados para VIA subtipo H3N2 han demostrado de igual forma que las cepas vacunales se encontraban genéticamente en clúster diferentes a las cepas circulantes, salvo durante el año 2007 [71].
- 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 de la pandemia [72].

Estos estudios 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 que estén más relacionadas y por lo tanto que sean más efectivas. La selección apropiada de las cepas a ser incluidas en las vacunas plantea un gran desafío debido a la continua generación de cambios en la proteína HA.

En los últimos 60 años el foco de investigación para el desarrollo de vacunas contra Influenza ha sido la región altamente variable de la cabeza globular de HA. Sin embargo, la última meta en la generación de vacunas es la producción de una vacuna universal que promueva la generación de anticuerpos contra epítopes conservados en las HAs, que estén accesibles al sistema inmune y que puedan ser capaces de neutralizar la mayor cantidad de subtipos posibles. Diversas investigaciones se han focalizado a la generación de anticuerpos monoclonales neutralizantes anti-HA, dirigidos a la región transmembrana de dicha proteína [73-75].

#### **1.2.8.2 Terapia antiviral**

El potencial impacto de una pandemia por virus Influenza hace que medidas efectivas para limitar la dispersión y morbilidad de la infección sea una prioridad en salud pública. Es entonces que los antivirales juegan un rol importante en la profilaxis y el tratamiento de la enfermedad. Actualmente existen dos clases de drogas distribuidas a nivel mundial, los Inhibidores de canal iónico y los Inhibidores de la neuraminidasa (NAIs). Este tipo de drogas pueden reducir las complicaciones asociadas y la duración de la enfermedad si se comienzan a utilizar dentro de las primeras 48 horas luego de iniciados los síntomas [76]. Algunos pacientes pueden, sin embargo, desarrollar una replicación viral sostenida a pesar del tratamiento antiviral, lo cual es un factor de riesgo para la aparición de cepas resistentes a los antivirales que están actualmente en el mercado [77].

Los inhibidores del canal iónico son los adamantanos (amantadina y rimantadina) y tienen como blanco de acción la proteína M2. Estos antivirales inhiben el intercambio de iones necesarios para acidificar el interior del virión y liberar las ribonucleoproteínas virales (RNPv) al citoplasma [78, 79]. Si bien los adamantanos están asociados a varios efectos secundarios, han sido ampliamente utilizados debido a su amplia disponibilidad y bajo costo. Sin embargo, en los últimos años se ha observado un creciente aumento en la resistencia a este tipo de fármacos [80-82]. Los virus resistentes comparten una sola sustitución en el aminoácido 31 de la proteína M2, cambiando de Serina por Asparagina (S31N) [80, 83, 84]. En el caso de los VIA H1N1pdm, se ha reportado que todos fueron resistentes a la Amantadina y Rimantadina [85, 86].

En lo que respecta a los NAIs, existen dos tipos de drogas licenciadas a nivel mundial para el tratamiento y profilaxis de Influenza, Relenza® (Zanamivir) y Tamiflu® (Oseltamivir) [87]. Por otro lado, la droga Peramivir ha sido aprobada únicamente para su utilización en adultos y niños en Japón, Corea del sur y China [88]. Estas drogas mimetizan al sustrato de la neuraminidasa y se unen al sitio activo, el cual es altamente conservado entre los virus de Influenza A y B [89], impidiendo la liberación viral y limitando la diseminación [90]. La administración de Oseltamivir se realiza por vía oral en una dosis de 75mg en adultos, dos veces al día y se recomienda no usar más de 5 días durante un tratamiento. Por otro lado, el Zanamivir se proporciona como un polvo y se administra por inhalación. Para los adultos, se recomiendan dos inhalaciones diarias de 5 mg para el tratamiento de infecciones, mientras que se recomienda una inhalación diaria de 10mg con fines profilácticos. Los efectos adversos a los NAIs incluyen vómitos, dolor abdominal y náuseas, pero son generalmente leves.

La emergencia de virus Influenza resistentes a los NAIs es un desafío a la eficiencia del tratamiento antiviral. Los marcadores moleculares asociados a la resistencia han sido identificados en el sitio catalítico de la enzima o cerca de éste, siendo diferentes para distintos subtipos virales.

En el caso de los virus de la Influenza A subtipo H1N1 la principal mutación asociada a la resistencia al Oseltamivir es un cambio de histidina por tirosina en la posición 275 de la NA (H275Y) [91-93]. A partir del año 2007, a nivel mundial se reportó un aumento significativo en la frecuencia de cepas A H1N1 H275Y y para la temporada 2008-2009 ésta sustitución se encontró en más del 99% de las cepas aisladas en Norteamérica y Europa [94]. Estudios realizados por Bloom y colaboradores reportaron que en ausencia de Oseltamivir, la mutación H275Y tiene un efecto perjudicial en la capacidad replicativa del virus. Para que la mutación se fije a escala global, esto es, que ocurra en el 100% de la población viral, es necesario que el efecto negativo sea contrarrestado por mutaciones secundarias localizadas en algún lugar del genoma viral. Las

sustituciones que restauran la capacidad replicativa de los virus H1N1 con la mutación H275Y fueron identificadas como R194G, V234M y R222Q en la proteína NA. El aumento en la frecuencia de estas mutaciones podría explicar la rápida emergencia y dispersión de los virus con la sustitución H275Y a pesar del bajo consumo del Oseltamivir [95].

Con la emergencia en el año 2009 de los virus A H1N1pdm, las cepas resistentes H1N1 que circulaban en la población fueron desplazadas y los nuevos virus pandémicos fueron naturalmente sensibles a los NAIs. Sin embargo, se han registrado virus con la sustitución H275Y. Más aún, diversos estudios indican que los casos de cepas resistentes surgieron tanto luego del tratamiento o profilaxis con Oseltamivir o Peramivir, así como también en pacientes no tratados [88, 96].

Si bien la gran mayoría de los casos de resistencia al Oseltamivir están asociados a la sustitución H275Y, otras sustituciones han sido asociadas a casos clínicos de resistencia. Las sustituciones I223R/T/M/V fueron detectada en virus resistentes al Oseltamivir así como al Zanamivir, aislados tanto de pacientes que habían estado expuestos a la droga como aquellos que no habían tenido contacto con ésta. Fue reportado que la mutación por sí sola confiere una reducción de la susceptibilidad contra el Oseltamivir, Zanamivir y Peramivir 45, 10 y 7 veces respectivamente [97] y que cuando se encuentra en combinación con la sustitución H275Y aumenta el IC<sub>50</sub> para el Oseltamivir y Peramivir aumenta 10 a 90 veces comparado con virus que llevan únicamente la sustitución H275Y, teniendo menor efecto en el caso de Zanamivir [88]. Asimismo, la sustitución N295S se ha asociado a casos de resistencia al Oseltamivir en virus de Influenza H1N1pdm, H3N2, y H5N1 [98-102]. La sustitución S247N ha sido asociada a un aumento en el IC<sub>50</sub> tanto para Oseltamivir como para Zanamivir [103].

Del total de casos resistentes reportados en el año 2009, 28% fueron aislados de pacientes inmunocomprometidos. Los restantes casos correspondieron a pacientes que habían estado expuestos al Oseltamivir en un 63% y en un 37% pacientes que nunca había estado en contacto con la droga ni con un individuo tratado [88].

Datos publicados por la OMS indican que para octubre del año 2011 habían sido reportados 605 casos de virus resistentes al Oseltamivir. Este número no representaría la cantidad de casos reales, ya que varios países han reportado una incidencia de 0.5 a 1% en sus localidades. Por tanto, esto sería equivalente a 5000 a 10000 virus resistentes por millón de casos y como fueron reportados más de 60 millones de casos solamente en Estados Unidos, podría haber miles de casos resistentes en un solo país. Para el año 2011 el 74% de estos casos se aislaron de pacientes que no habían estado en contacto con la droga, indicando un aumento en la transmisión de estos virus en la población [88]. Análisis genéticos han demostrado que estos virus fueron genéticamente idénticos, sugiriendo la emergencia a partir de un mismo ancestro

[104]. Se ha observado que la sustitución H275Y en los virus H1N1 pdm aislados en el 2009 provocaban la disminución de los niveles expresión de la NA, disminuyendo el fitness viral [95]. El aumento de la frecuencia a partir del año 2011 sugiere que estos virus han adquirido la capacidad de llevar la mutación H275Y sin comprometer el fitness viral. Butler y colaboradores identificaron las sustituciones, (241I y N369K, que permiten la adquisición de la mutación H275Y sin comprometer el fitness viral [105]. Más aún, Bloom y colaboradores identificaron otra sustituciones (R257K, T289M y V234M) como capaces de permitir adquisición del fenotipo resistente [106]. La complejidad de los patrones detrás de la generación de cepas resistentes pone de manifiesto la necesidad de la vigilancia de estos virus.

El posible aumento en la frecuencia de resistencia al Oseltamivir es de preocupar ya que ésta droga es en la actualidad el agente antiviral más utilizado para el control de las infecciones por virus Influenza. Es por esta razón que nos resulta de gran interés la realización de estudios donde se caractericen las variantes virales circulantes en nuestro país y en la región. Asimismo, tomando en cuenta la circulación en forma de cuasiespecies de estos virus nos interesa realizar una detallada caracterización molecular de la diversidad poblacional de los VIA H1N1pdm circulantes en Uruguay utilizando NGS, de forma de evaluar variantes minoritarias con mutaciones de resistencia.

#### **1.2.8.3 Nuevos desafíos en la terapia antiviral.**

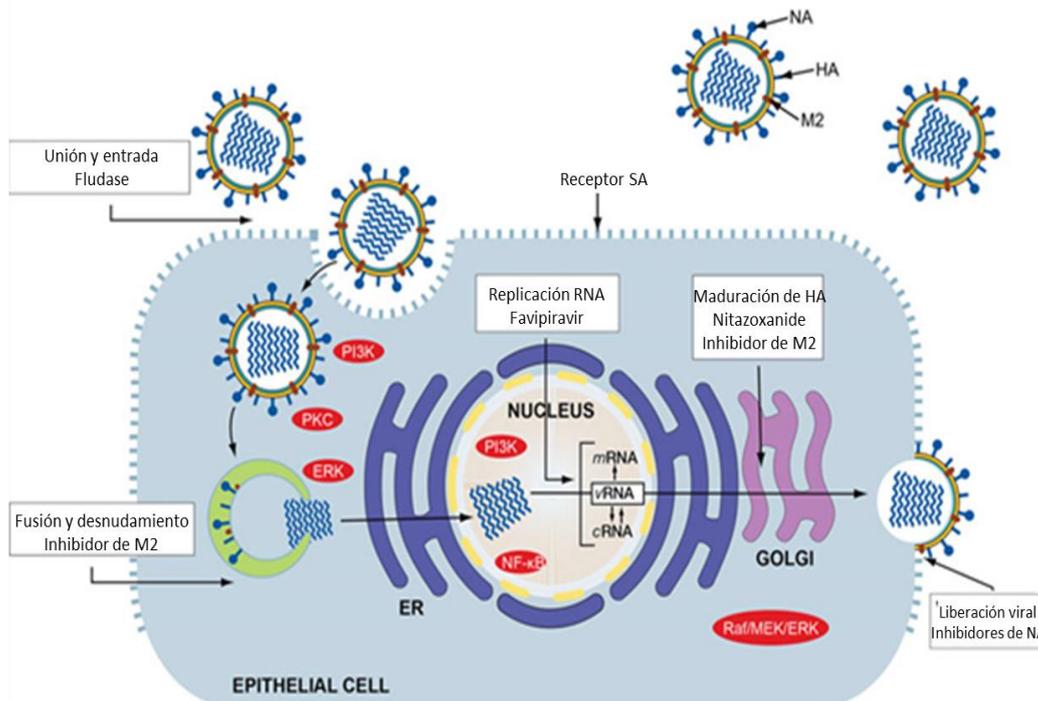
Actualmente existen nuevas drogas antivirales como DAS181 (Fludase), Favipiravir (T-705) y la Nitazoxanida, las cuales están siendo evaluadas en ensayos clínicos para la prevención y tratamiento de la gripe [49].

Fludase consiste en un dominio catalítico sialidasa de origen bacteriano unido a un factor de crecimiento del epitelio respiratorio, como un dominio de anclaje requerido para el direccionamiento a las células del epitelio respiratorio. La actividad sialidasa escinde los enlaces  $\alpha 2,3$  y  $\alpha 2,6$  unidos al ácido siálico en la superficie celular y su remoción previene la unión de los virus Influenza. Fludase es una estrategia prometedora en lo que respecta a la prevención y tratamiento de la gripe, mostrando en diferentes estudios *in vitro* e *in vivo* la reducción de carga viral y diseminación contra una amplia gama de virus Influenza tanto A como B. Sin embargo, las contraindicaciones del potencial uso de esta droga todavía no han sido abordadas.

Por otro lado, Favipiravir tiene un mecanismo de acción diferente. Esta droga inhibe selectivamente la RNA polimerasa viral ya que compite con las purinas y es incorporado por error por la RNA polimerasa viral. Esta droga de igual forma que Fludase, muestra actividad antiviral contra una amplia gama de tipos y subtipos de

virus Influenza, incluyendo cepas NAI resistentes. Asimismo ha mostrado una gran actividad antiviral en estudios *in vivo* con cepas altamente patogénicas como H5N1, estando actualmente en fase 2 de ensayos clínicos en los Estados Unidos.

La Nitazoxanida es un agente antiparasitario y se observó en estudios *in vitro* su actividad antiviral frente a una amplia gama de virus de DNA y RNA, incluyendo el virus de la hepatitis B, hepatitis C y de la Influenza. Para este último, el mecanismo de acción no ha sido plenamente dilucidado hasta la fecha. Sin embargo, algunos estudios sugieren que Nitazoxanida bloquea la glicosilación terminal de la glicoproteína HA impidiendo su tráfico por la vía secretoria hacia la superficie. Ensayos clínicos han demostrado buena seguridad y actualmente está en etapa de desarrollo clínico [49], ver figura 10.



**Figura 10. Mecanismo de acción de los antivirales.** La figura muestra a qué nivel del ciclo actúan los antivirales. El Fludase impide la entrada del virus a la célula, mientras que el Favipiravir como los NAIs permite la entrada del virus pero impide la replicación viral. La Nitazoxanida y los inhibidores de neuraminidasa actúan al final del ciclo viral impidiendo la glicosilación y transporte de HA por la vía secretoria o a nivel de la liberación de los nuevos virus. Extraído y adaptado de Webster & Govorkova, 2014.

## **2. Objetivos generales**

### **2.1 Objetivo general Capítulo I**

Profundizar en el estudio de la variabilidad genética de las estirpes del virus Influenza A H1N1pdm que circularon en nuestro país, así como en la región sudamericana, entre los años 2009 al 2013.

### **2.2 Objetivo general Capítulo II**

Analizar la dinámica poblacional de variantes virales del virus Influenza A H1N1pdm entre los años 2009 al 2013 mediante secuenciación masiva.

### **2.3 Objetivo general Capítulo III**

Estudiar la dinámica poblacional y compartimentalización de virus RNA durante el transcurso de una infección *in vivo*.

**3. CAPÍTULO I: Variabilidad genética de las estirpes del Virus Influenza A H1N1pdm que circularon en nuestro país así como en la región sudamericana entre los años 2009 al 2013**

### **3.1 Objetivo general Capítulo I:**

Profundizar en el estudio de la variabilidad genética de las estirpes de gripe A H1N1 que circularon en nuestro país, así como en la región sudamericana, entre los años 2009 al 2013.

#### **Objetivos Específicos**

Amplificar por PCR los segmentos génico HA y NA de virus Influenza A H1N1pdm aislados a partir de muestras clínicas.

Determinar la variabilidad genética de virus Influenza que circulan en Uruguay y en la región sudamericana y la relación de estas cepas con las estirpes introducidas en las vacunas para el hemisferio sur.

Determinar la eficacia de la vacuna seleccionada para el hemisferio sur en el año 2009, en el período de tiempo estudiado.

Determinar polimorfismos asociados a resistencias a los antivirales.

## **3.2 Materiales y Métodos Capítulo I**

### **3.2.1 Muestras**

Se analizaron 29 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 Grave (IRAG), tomadas en un período de tiempo que abarca el año 2009 al 2013.

La información correspondiente a cada uno de los pacientes se detalla en la tabla 1. Dichas muestras fueron provistas por la Asociación Española Primera de Socorros Mutuos (AEPSM), en el Marco del proyecto Alianza “Diagnóstico molecular de virosis emergentes de gran impacto en salud pública” PE\_ALI\_2009 11603 -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 H1N1 mediante la técnica de Real-Time PCR, de acuerdo a las instrucciones del kit comercial de Roche [107].

### **3.2.2 Extracción de RNA**

El RNA total fue extraído a partir de las muestras clínicas utilizando el kit High pure Nucleic Acid de Roche, de acuerdo a las instrucciones suministradas por el fabricante. El RNA obtenido se utilizó para la obtención de cDNA y parte de este material fue almacenado a -80°C para su posterior utilización.

### **3.2.3 Retrotranscripción**

A partir del RNA extraído se realizó la retrotranscripción (RT) utilizando la enzima SuperScrip II Reverse Transcriptase (Invitrogen). Como primers se utilizaron hexameros al azar de forma de obtener cDNA proveniente de todas las regiones del genoma viral. Para ello, 5µl del RNA extraído fue adicionado a una mezcla que contenía 5µL de H<sub>2</sub>O, 1µl de dNTPs (10Mm) y 1µl de hexameros (250ng).

La mezcla fue incubada 5min a 65°C y luego 1min en hielo. Posteriormente se preparó una segunda mezcla conteniendo 4µl de una solución tampón 5X, 2µl de DDT (0,1M) y 1µl de H<sub>2</sub>O. Se adicionó 7µl de la mezcla 2, en la mezcla 1 y se incubó por 2min a 25°C. Luego se agregó 1µl de SuperScrip II Reverse Transcriptase (200U/µl) y se incubó en un termociclador 2720 ThermalCycler (Applied Biosystems) 10min a 25°C, 50min a 42°C, y 15min a 70°C.

**Tabla 1. Características clínicas y moleculares de los pacientes analizados.** Se detalla la identidad de cada muestra, la edad de cada paciente, el tipo de muestra y el dato clínico. También se muestra el resultado de la RT-PCR en tiempo real para cada muestra. EPOC (Enfermedad pulmonar obstructiva crónica), IRA (Insuficiencia respiratoria aguda), IRAG (Insuficiencia respiratoria aguda grave), NAC (Neumonía aguda comunitaria), S/D (Sin dato).

Año	Muestra	Edad	M2	H1N1	CT	Sexo	Tipo de muestra	Dato clínico
2009	1	S/D	Positivo	Positivo	S/D	S/D	SD	S/D
	3	S/D	Positivo	Positivo	S/D	S/D	SD	S/D
	4	S/D	Positivo	Positivo	S/D	S/D	SD	S/D
	5	S/D	Positivo	Positivo	S/D	S/D	SD	S/D
	6	S/D	Positivo	Positivo	S/D	S/D	SD	S/D
2011	34	37a	Positivo	Positivo	35,71	M	Hisopo nasal	Neuropatia aguda
	35	39a	Positivo	Positivo	35,42	M	Hisopo nasal	Chequeo IRA
	37	57a	Positivo	Positivo	34,68	M	Hisopo nasal	Probable neumonia H1N1
	45	RN	Positivo	Positivo	26,6	F	ANF	RN
	48	28a	Positivo	Positivo	35,41	F	Hisopo nasal	NAC
	56	49a	Positivo	Positivo	37,73	M	Hisopo nasal	Diabetes, obesidad, tos, mialgia, odinofagia, Cefalea, Insuf resp
	88	38a	Positivo	Positivo	29,64	M	Hisopo nasal	Broncoespasmo, fiebre, tos, mialgia, odinofagia
	90	70a	Positivo	Positivo	32,16	M	Hisopo nasal	NACQ
	92	23a	Positivo	Positivo	27,04	F	Hisopo nasal	Neumonia IREN
	96	42a	Positivo	Positivo	28,01	F	Hisopo nasal	S/D
	98	80a	Positivo	Positivo	31,19	M	Hisopo nasal	EPOC, bronqueoectasias, fiebre, insuf resp
	103	28a	Positivo	Positivo	35,53	F	ANF	IRA, probable H1N1
	108	44a	Positivo	Positivo	23,25	F	ANF	Sind. Dawn, fiebre, tos, insuf resp, compromiso hemodinamico
	112	63a	Positivo	Positivo	13,14	M	Hisopo nasal	NA lcard
	113	5m	Positivo	Positivo	27,71	M	ANF	Tos, insuf resp, compromiso hemodinamico
117	35a	Positivo	Positivo	33,22	F	Hisopo nasal	S/D	
118	28a	Positivo	Positivo	32,79	F	Hisopo nasal	Asma, tos	
141	62a	Positivo	Positivo	33,26	M	Hisopo nasal	S/D	
154	62a	Positivo	Positivo	29,82	F	Hisopo nasal	IR	
2013	253	S/D	Positivo	Positivo	S/D	F	ANF	S/D
	254	S/D	Positivo	Positivo	S/D	F	Hisopo nasal	S/D
	259	S/D	Positivo	Positivo	S/D	M	Hisopo nasal	S/D
	271	S/D	Positivo	Positivo	S/D	F	Hisopo nasal	S/D
	272	S/D	Positivo	Positivo	S/D	F	Hisopo nasal	S/D

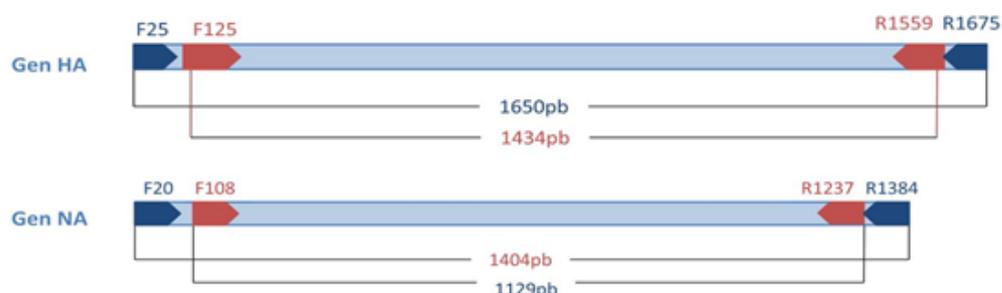
### **3.2.4. Amplificación por PCR los genes HA y NA**

A partir de los cDNA preparados anteriormente se procedió a la amplificación de los genes HA y NA, siguiendo el diagrama de amplificación que se muestra en la figura 11. Se utilizó la enzima Platinum Taq DNA Polymerase High-Fidelity (Invitrogen) y primers diseñados en nuestro laboratorio, ver tabla 2.

Para ello, se agregaron 5µl de cDNA a una mezcla con un volumen final de 50µl, conteniendo 5µl de una solución tampón 10X, 1µl de cada cebador 10mM (F25, R1675 para el gen HA) y (F20, R1384 para el gen NA), 1µl de dNTPs 10mM, 2µl de MgSO<sub>4</sub> 50 mM, 0,3µl de enzima (5U/ul) Platinum Taq DNA polymerase (Invitrogen), y 34.5µl de H<sub>2</sub>O MiliQ. La totalidad de la mezcla se calentó durante 5 min a 94°C y luego 30 ciclos con una temperatura de desnaturalización de 94°C por 1 min, hibridación a 51°C por 1 min y de extensión a 68 °C por 2 min. Luego de los 30 ciclos se mantuvo 10 min a 68°C.

Al tratarse de muestras clínicas, la carga viral no fue suficiente para observar un producto de amplificación luego de una primera ronda (primer round) de amplificación por PCR. Por lo tanto, con el fin de aumentar la sensibilidad y especificidad del ensayo se realizó una nested PCR utilizando un segundo round de PCR a partir de 1µl el primer round. Para el segundo round de amplificación se preparó una mezcla conteniendo 5µl de una solución tampón 10X, 1µl de cada cebador 10µM, (F125, R1559 para el gen HA) y (F108, R1237 para el gen NA), ver figura 11. Posteriormente se adicionó a la mezcla 1µl de dNTPs 10mM, 1.5µl de MgCl<sub>2</sub> 50mM, 0,5µl de enzima (5U/ul) Platinum Taq DNA polymerase (Invitrogen), y 39µl de H<sub>2</sub>O MiliQ. El ciclado fue de 94°C durante 5 min y luego 30 ciclos con una temperatura de desnaturalización de 94°C por 1 min, hibridación a 52°C por 1 min y de extensión a 72°C por 2 min. Luego de los 30 ciclos se mantuvo por 10 min a 72°C.

Todas las reacciones de PCR fueron realizadas en un termociclador 2720 ThermalCycler (Applied Biosystems). En todos los casos se utilizaron tanto controles negativos (agua ultra pura libre de RNAasas en lugar de ácidos nucleicos), así como controles positivos (RNA extraído de extractos de cultivos previamente infectados con Influenza A H1N1). Los productos de amplificación fueron almacenados a -20°C hasta su utilización.



**Figura 11. Diagrama de la amplificación por PCR.** Se representa la posición en cada uno de los genes donde se unen los primers y el tamaño de cada producto de PCR esperado. En color azul se indican los primers utilizados en el primer round de PCR y en rojo los que se utilizaron en el segundo round.

**Tabla 2: Primers utilizados para la amplificación por PCR y secuenciación.**

Segmento génico	Nombre del primer	Secuencia (5'-3')	Posición de hibridación	Tm asociada °C	Tamaño amplicón (pb)
HA	F25	CTATATACATTTGCAACCGC	25	51	1650
	R1675	CATATTCTACACTGTAGAGA	1675		
	F125	CAGTAACACACTCTGTTAAC	125	52	1434
	R1559	CCTTGTTGATTCCAGCTTTC	1559		
NA	F20	TAATAACCATTGGTTCGGTC	20	51	1404
	R1384	TCAATGGTAAATGGCAACTC	1384		
	F108	CTCAATTCAACTGGGAATC	108	52	1129
	R1237	CTTATACAATCCAGCCCTGT	1237		

### **3.2.5 Electroforesis en gel de agarosa y purificación de los productos de PCR**

Se realizaron geles de agarosa al 1.2 % en buffer TAE 0.5X (40mM Tris base (pH 7.6), 20mM ácido acético glacial, 1mM EDTA). Se sembraron los 50µl de cada producto de PCR con 10µl de buffer de carga 6X, compuesto de Azul de bromofenol y Xilencianol. La corrida fue realizada durante 30min a 90 voltios (V).

Para visualizar los productos de PCR se utilizó el documentador de geles con luz UV (Gel Doc X5 170-8170, Biorad), y el intercalante good view, el cual se activa bajo luz UV. Los tamaños de bandas esperados para cada gen fueron de 1434pb para HA y 1129 para NA, siendo verificados al comparar con un peso molecular 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen).

Los productos de PCR fueron purificados a partir de gel utilizando el kit de purificación QIAquick Gel Extraction Kit de Quiagen y el kit GE Healthcare illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit siguiendo las instrucciones del fabricante.

### **3.2.6 Secuenciación por Sanger**

La secuenciación de los productos de PCR fue realizada en el servicio de Secuenciación de la Unidad de Biología Molecular del Instituto Pasteur de Montevideo a través de un secuenciador automático de 4 capilares.

### **3.2.7 Edición y Análisis de secuencias**

Los cromatogramas obtenidos fueron analizados y corregidos manualmente utilizando el programa bioinformático CHROMAS, versión 2.32 (Technelysium). Luego de la edición, dichas secuencias fueron analizadas con el algoritmo Nucleotide BLAST (NCBI) para corroborar su identidad. Posteriormente, las secuencias de cada segmento génico (HA y NA) fueron alineadas con la cepa vacunal A/California/07/2009, la cual fue recomendada para el hemisferio sur durante el período (2010-2013), mediante el software del programa MEGA 5.0 [108].

Con el objetivo que estudiar motivos específicos de secuencias de aminoácidos, las secuencias nucleotídicas se tradujeron automáticamente y luego se compararon con la cepa vacunal.

Las secuencias de HA y NA fueron alineadas con secuencias correspondientes a cepas de Influenza A H1N1 que circularon en la región sudamericana 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> y la base de datos GISAID disponible en <http://platform.gisaid.org/epi3/frontend#1efd89> , con el objetivo de evaluar las relaciones filogenéticas entre estas cepas y la cepa vacunal, así como también marcadores de resistencia a los antivirales en las cepas uruguayas y de la región.

A fin de determinar el modelo evolutivo que mejor describía nuestro juego de datos, se utilizó el programa Modelgenerator [109], 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 serie de datos y tenga el mínimo AIC.

### **3.2.8 Análisis filogenéticos**

Utilizando el modelo obtenido mediante el programa Model Generator, se construyó un árbol filogenéticos de máxima verosimilitud (Maximum Likelihood) para HA y para NA con el programa PhyML [110], disponible en <http://www.phylogeny.fr/phylo.cgi/phym1>. Como medida de la robustez de cada rama del árbol se utilizó 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 [111]. Una vez obtenidos los árboles filogenéticos, se procedió a la edición de los mismos utilizando el programa FigTree v1.4.1 (disponible en <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>).

### **3.2.9 Mapeo de sustituciones aminoacídicas.**

Con el objetivo de analizar en que región de la proteína se localizaban los sitios donde ocurrieron las sustituciones aminoacídicas en las secuencia de HA y NA, se mapearon los sitios involucrados mediante el software PyMOL, (The PyMOL Molecular Graphics System, version 1.3; Schrödinger, LLC disponible en <https://www.pymol.org/>, utilizando las estructuras cristalográficas para ambas proteínas, cuyo PDB fue, 3B7Q para NA y 3LZG para HA.

#### **3.2.9a. Predicción de epítopes y sitios de N-glicosilación.**

La predicción de epítopes B lineales que son reconocidos por los anticuerpos del sistema inmune fue realizada utilizando el servidor BepiPred, disponible en <http://www.cbs.dtu.dk/services/BepiPred/>. Los programas para la predicción de epítopes B se basan en propiedades físico-químicas de las proteínas y en el uso de redes neuronales. La predicción de epítopes en células B es una de las técnicas computacionales por excelencia que están siendo empleadas para el diseño racional de vacunas. El programa BepiPred considera que un aminoácido contribuye a un potencial epítope B si dicho valor es igual o superior a 0,35.

Los potenciales sitios de N-glicosilación fueron predichos utilizando el servidor NetNGlyc 1.0 disponible en <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>.

El servidor NetNGlyc predice sitios de N-glicosilación en secuencias protéicas mediante un modelo de redes neuronales artificiales que examinan el contexto de secuencias con el motivo Asn-Xaa-Ser/Thr. El valor umbral  $> 0.5$  es un marcador promedio para potenciales sitios de glicosilación.

### **3.2.9b Determinación de la eficacia de la vacuna para las cepas pandémicas y post pandémicas**

La distancia antigénica entre la cepa vacunal y las cepas que conforman el grupo en el cual se encuentran las cepas uruguayas y de la región fue calculada usando el método de p-epítotope. En este método, la distancia antigénica entre dos cepas es calculada a partir de la secuencia aminoacídica en los cinco epítotos de la proteína HA. Para cada epítotope, el valor P está definido como la proporción de diferencias aminoacídicas entre dos cepas. El mayor valor P está definido como *p-epítotope*, y el correspondiente epítotope es definido como el epítotope dominante, ya que dicho epítotope está influenciado por la presión selectiva del sistema inmune [112]. Los valores P fueron determinados usando el programa MEGA 5.0 [108]. Considerando únicamente las sustituciones que ocurren en el epítotope dominante, la teoría del p-epítotope provee una predicción de la eficacia de la vacuna estimada por la ecuación  $E = (0.47 - 2.47 \times p\text{-epítotope})$ , donde E es la eficacia de la vacuna. Dicha eficacia tiene una correlación lineal con la distancia antigénica entre la cepa vacunal y la cepa circulante [113, 114]. Esta ecuación también predice que la eficacia de la vacuna no es positiva para valores de p-epítotope  $> 0.19$  [114].

### **3.3 Resultados Capítulo I**

#### **3.3.1 Amplificación por PCR de los segmentos génicos HA y NA a partir de muestras clínicas**

Partimos de 29 muestras que habían sido positivas para Influenza A H1N1pdm mediante PCR en tiempo real. De las 29 muestras, 5 pertenecían a aislados clínicos del año 2009, 19 fueron aislados durante el año 2011 y 5 en el año 2013. A partir de estas muestras se realizó la extracción de RNA, retrotranscripción y posterior amplificación de los segmentos génicos HA y NA. Durante el primer round de amplificación no se detectó producto de PCR en el gel de agarosa, por lo tanto se procedió a una segunda ronda de amplificación (segundo round). En esta oportunidad se logró obtener los fragmentos de tamaño deseado para cada uno de los genes estudiados, 1534pb para el gen HA y 1129pb para el gen NA.

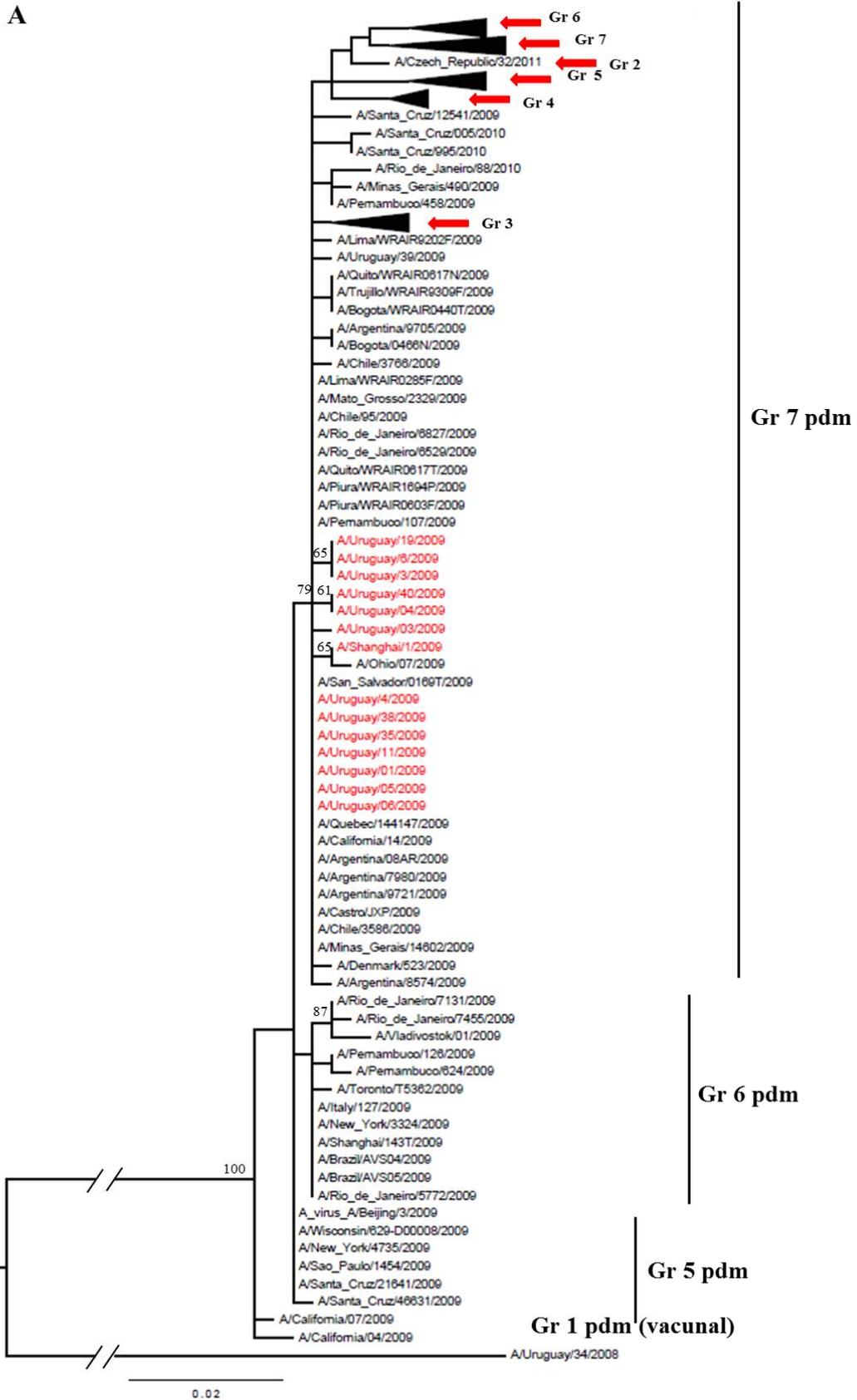
En la tabla 3 se detallan las muestras para la cuales se obtuvo amplicón en el segundo round de PCR. Se obtuvo producto de amplificación en la gran mayoría de las mezclas de reacción que contenían cDNA como molde, logrando un 93% de eficiencia en el método de amplificación del gen HA y un 89% para el gen NA. Asimismo y conforme a lo esperado, no se obtuvieron productos de amplificación en las mezclas de PCR donde se sustituyó el cDNA por agua para la reacción del control negativo. Una vez obtenidos los amplicones, éstos fueron purificados y secuenciados bidireccionalmente por el método de Sanger.

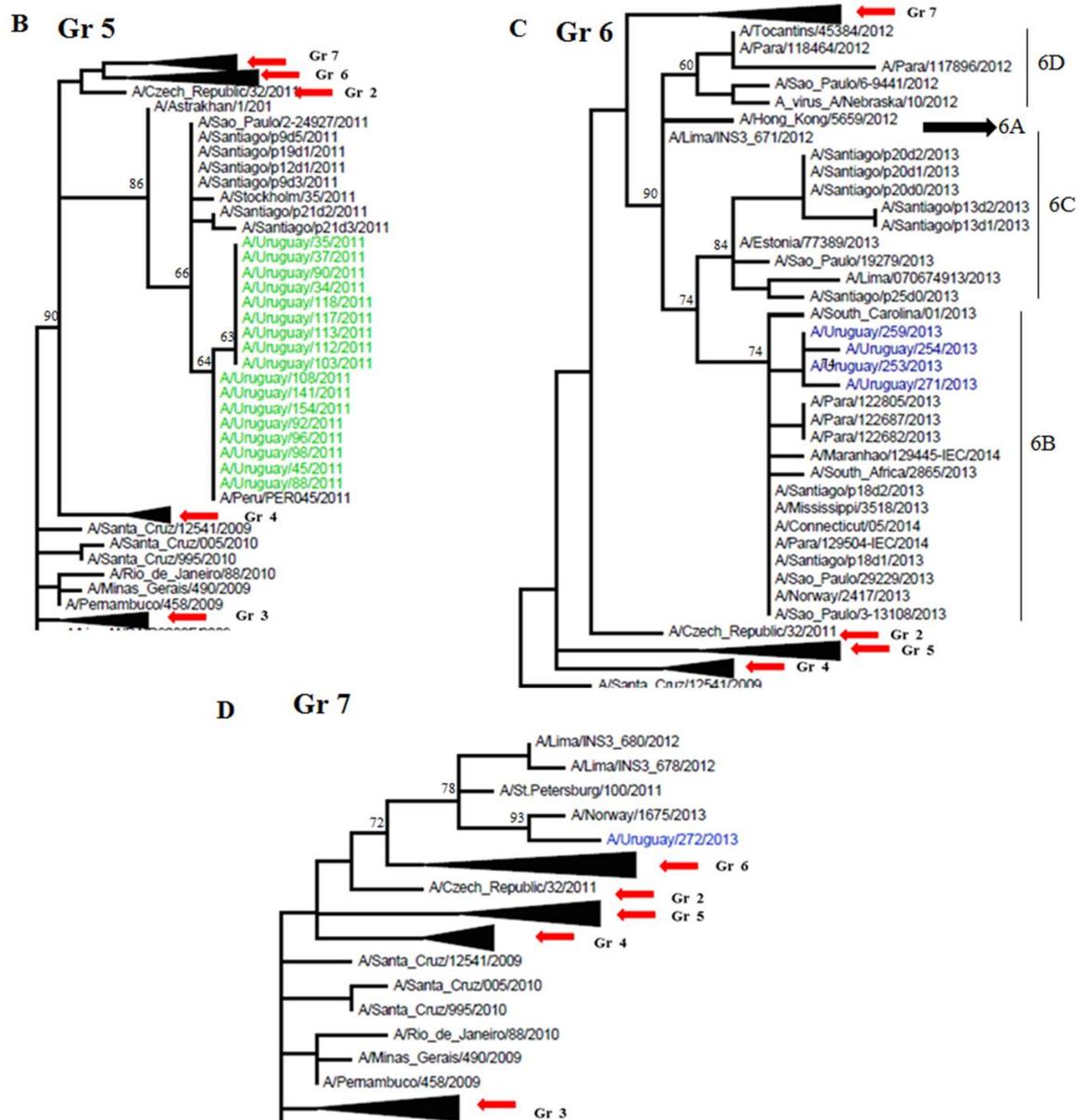
**Tabla 3. Amplicones obtenidos en el segundo round de PCR para cada uno de los genes estudiados.**

Año	Muestra	HA	NA
2009	1	✓	✓
	3	✓	✓
	4	✓	✓
	5	✓	x
	6	✓	✓
2011	34	✓	x
	35	✓	✓
	37	✓	✓
	45	✓	✓
	48	x	✓
	56	x	x
	88	✓	✓
	90	✓	✓
	92	✓	✓
	96	✓	✓
	98	✓	✓
	103	✓	✓
	108	✓	✓
	112	✓	✓
	113	✓	✓
117	✓	✓	
118	✓	✓	
141	✓	✓	
154	✓	✓	
2013	253	✓	✓
	254	✓	✓
	259	✓	✓
	271	✓	✓
	272	✓	✓

### **3.3.2 Determinar la variabilidad genética de VIA que circulan en Uruguay y en la región sudamericana y la relación de estas cepas con las estirpes introducidas en las vacunas para el hemisferio sur en cada año mediante abordajes filogenéticos**

Con el objetivo de estudiar la variabilidad genética de los virus Influenza A H1N1pdm que circularon en Uruguay durante los años 2009 al 2013, la relación de éstos con cepas aisladas en la región sudamericana y con la cepa vacunal recomendada para el hemisferio sur para los años de estudio (A/California/07/2009), se realizó en primer instancia un análisis filogenético utilizando el segmento génico HA. Es importante destacar que la región estudiada comprendió desde el aminoácido 86 al 488. Para ello, construimos un dataset conteniendo 113 secuencias de HA, 36 de ellas pertenecían a cepas aisladas en Uruguay y de las cuales 27 fueron obtenidas durante esta tesis. El resto de las secuencias se obtuvieron de la base de datos de Influenza de los Alamos (FLU LANL database) y la base de datos GISAID. El dataset incluyó además secuencias representativas de los clados identificados en el periodo pandémico y post-pandémico. El resultado de este análisis se muestra en la figura 12.





**Figura 12.** Árbol filogenético de máxima verosimilitud del segmento génico HA de virus Influenza A H1N1pdm. Para el análisis se utilizaron 114 secuencias, 36 pertenecían a muestras uruguayas, el resto de las secuencias pertenecían a otros países de la región sudamericana, así como secuencias de referencia para los grupos Gr 1, Gr 5-pdm, Gr 6-pdm y Gr 7-pdm y grupos post pandémicos Gr 5, Gr 6 y Gr 7. Además se agregó al análisis una secuencia de HA de un virus H1N1 del año 2008 (A/Uruguay/34/2008), como grupo externo. Se utilizó el modelo estadístico de Maximum Likelihood y como prueba de la filogenia se utilizó el método bootstrap con un número de 1000 réplicas. El modelo de sustitución nucleotídica empleado fue el Hasegawa-Kishino-Yano (HKY) + gamma. Los números de cada nodo representan el valor de bootstrap y la barra inferior de la figura denota distancia. Las cepas uruguayas pertenecientes al año 2009 se muestran en rojo, las del año 2011 en verde y las del 2013 en azul. La figura 15(A), muestra los grupos filogenéticos que circularon durante la pandemia en la región sudamericana y se observan los distintos grupos post pandémicos. El asterisco indica en cuales de estos grupos se encontraron las secuencias uruguayas. 15(B), 15(C) y 15(D) muestran los grupos Gr 5, Gr 6 y Gr 7.

Basados en la secuencia del gen HA identificamos un único grupo filogenético que circuló durante el año 2009 para las muestras uruguayas. Este grupo se identificó como Gr 7-pdm debido a que las secuencias se encontraron en el mismo cluster genético que las secuencias de referencia para ese cluster (A/Shanghai/1/2009, A/Ohio/07/2009, A/Denmark/523/2009, A/California/14/2009 y A/Quebec/144/2009). Asimismo, el análisis filogenético reveló que este grupo fue el más distribuido a lo largo de la región sudamericana, ya que la mayoría de las secuencias se encontraron allí. Una situación diferente se puede apreciar en el caso de Brasil, donde diferentes cepas aisladas en este país se agruparon además en otros cluster filogenéticos como Gr 5-pdm y Gr 6-pdm, junto a secuencias de referencia para estos clusters (A/New York/4735/2009, A/Beijing/3/2009 y A/Wisconsin/629-D00008/2009) para el grupo Gr 5-pdm y (A/Italy/127/2009, A/New York/3324/2009, A/Shanghai/143T/2009 y A/Toronto/T5362/2009) para el grupo Gr 6-pdm.

Por otro lado, en la figura 12(A) se muestra la generación los grupos filogenéticos que circularon en el período post pandémico (Gr 2 al Gr 7) diversificados a partir del grupo Gr 7-pdm. Mediante este abordaje filogenético se pudo determinar que las cepas uruguayas aisladas en el período post pandémico (año 2011 al 2013) se localizaron en los grupos Gr 5, Gr 6 y Gr 7. Las secuencias correspondientes a las cepas aisladas en Uruguay durante el año 2011 se agruparon junto a la secuencia de referencia para el grupo Gr 5 (A/Astrakhan/1/2011), ver figura 12(B). En este grupo también se encontraron secuencias pertenecientes a Chile y Perú. Durante el año 2013, el grupo Gr 5 fue reemplazado por las cepas pertenecientes al grupo Gr 6 y Gr 7, las cuales co-circularon en el mismo periodo de tiempo. Una de las cinco secuencias de cepas Uruguayas aisladas en el año 2013 se localizó junto a la secuencia de referencia del grupo Gr 7 (A/St.Petersburg/100/2011). Por otro lado, cuatro de las cinco secuencias obtenidas ese año en Uruguay se agruparon con secuencias de referencia para el grupo Gr 6, localizándose todas ellas en el subgrupo 6B junto a A/Mississippi/3518/2013, A/Connecticut/05/2014 y A/South Carolina/01/2013, ver figura 12 C y 12 D.

A fin de poder profundizar aún más en el estudio de la variabilidad genética de estos virus, realizamos un análisis filogenético de 44 secuencias del segmento génico NA de cepas de Influenza A H1N1pdm aisladas en Uruguay entre los años 2009 al 2013. La región analizada comprendió desde el aminoácido 56 al 401. El resultado del análisis se muestra en la figura 13.

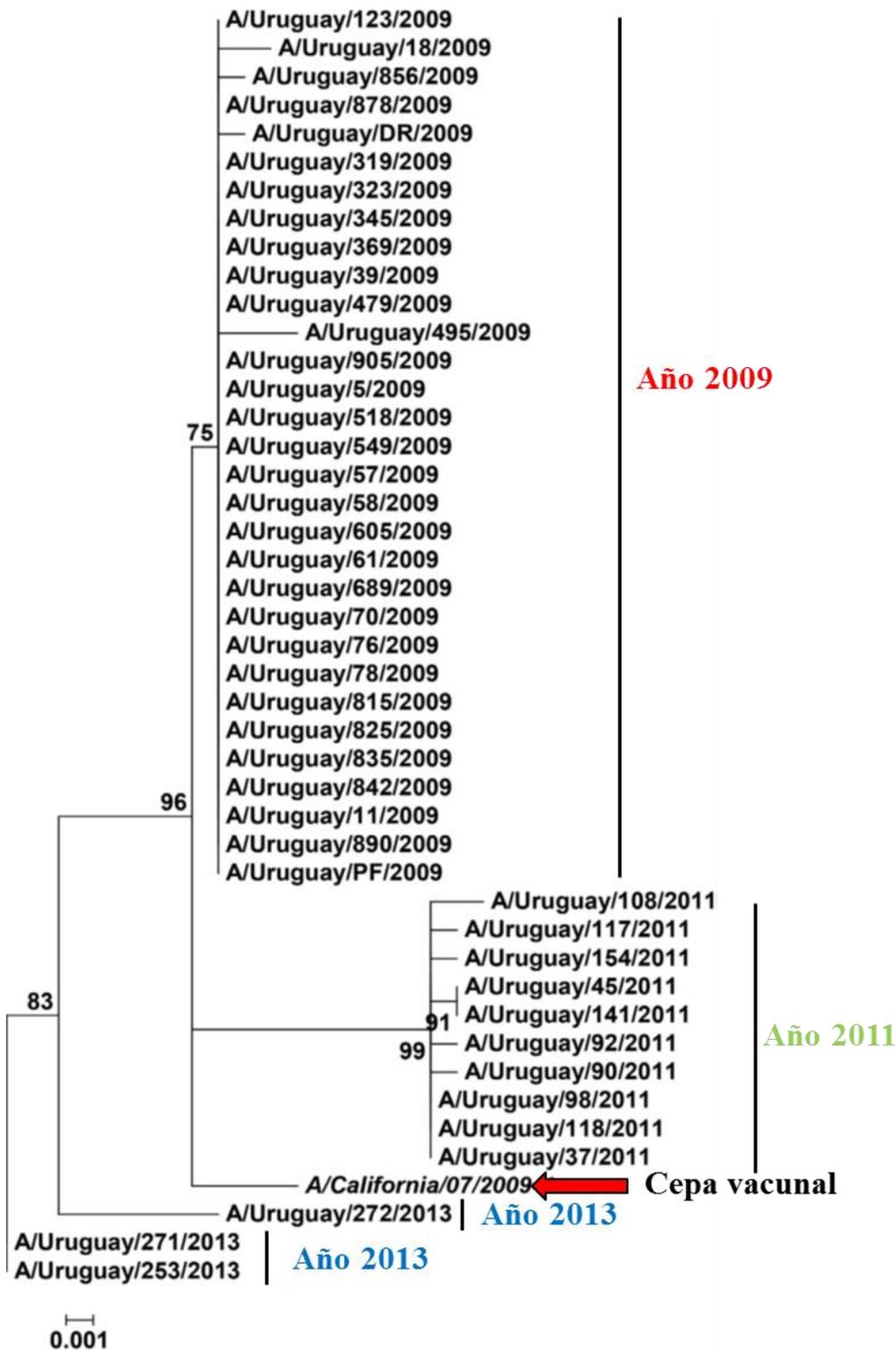


Figura 13. Árbol de máxima verosimilitud realizado para el segmento génico NA de las cepas de Influenza A H1N1pdm circulantes en Uruguay. Cada cepa en el árbol se indica con el nombre y en cada nodo se indica el valor de aLRT. La barra inferior de la figura denota distancia. La cepa vacunal recomendada para el hemisferio sur durante el año 2010–2013 (A/California/7/2009) se indica con una flecha.

Mediante este análisis se pudo determinar nuevamente que todas las cepas aisladas en el año 2009 se agrupan juntas y las cepas aisladas en los distintos años se agrupan en cluster distintos. Todos estos grupos fueron apoyados con altos valores de aLTR. Asimismo, se puede observar que las cepas del año 2009 están más relacionadas genéticamente entre si y mantienen cierta distancia genética con aquellas aisladas en el año 2011 y 2013 y que la cepa vacunal A/California/7/2009 mantiene además una distancia genética considerable con todas las cepas en las tres temporadas estudiadas. Finalmente, este estudio evidenció la co-circulación de dos linajes genéticamente distintos en el año 2013.

### **3.3.3 Caracterización de las cepas uruguayas estudiando el segmento génico HA y NA**

#### **3.3.3.1 Estudio de sustituciones en el segmento génico HA**

Con el objetivo de caracterizar las cepas de VIA que circularon en Uruguay durante el año 2009 al 2013 en una primera instancia se analizaron los cambios de aminoácidos que se generaron durante los tres años de estudio. Dichas secuencias fueron comparadas con la cepa vacunal (A/California/07/2009). Para llevar adelante este estudio se alinearon las secuencia de HA con la cepa vacunal utilizando el programa Clustal W [115] y posteriormente se tradujeron las secuencias de nucleótidos a aminoácidos utilizando el programa MEGA 5 [108]. Los resultados de estos estudios se muestran en la tabla 4 y anexo-capitulo I.

**Tabla 4. Sustituciones de aminoácidos en el segmento génico HA de cepas uruguayas comparando con la cepa vacunal (A/California/07/2009).**

Cepas	100	101	114	125	138	146	155	160	180	202	214	220	222	233	266	240	273	300	338	356	373	391	419	468
A/California/07/2009	P	S	D	V	S	N	H	S	K	S	A	S	R	I	V	R	A	K	I	G	E	E	K	S
A/Uruguay/3/2009	S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	-	-	-	Q	-	-	V	R	-	-	-	-
A/Uruguay/4/2009	S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	-	-	-	Q	-	-	V	-	-	-	-	-
A/Uruguay/6/2009	S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	-	-	-	Q	-	-	V	R	-	-	-	-
A/Uruguay/8/2009	S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	-	-	-	Q	-	-	V	R	-	-	-	-
A/Uruguay/11/2009	S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	-	-	-	Q	-	-	V	-	-	-	-	-
A/Uruguay/19/2009	S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	-	-	-	Q	-	-	V	R	-	-	-	-
A/Uruguay/35/2009	S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	-	-	-	Q	-	-	V	-	-	-	-	-
A/Uruguay/38/2009	S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	-	-	-	Q	-	-	V	-	-	-	-	-
A/Uruguay/39/2009	S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	-	-	-	Q	-	-	V	-	-	-	-	-
A/Uruguay/40/2009	S	-	-	M	-	-	-	-	-	-	-	T	-	-	-	Q	-	-	V	-	-	-	-	-
A/Uruguay/01/2009	S	-	N	-	-	-	-	-	-	-	-	T	-	-	-	Q	-	-	V	-	-	-	-	-
A/Uruguay/03/2009	S	-	-	-	N	-	-	-	-	-	-	T	-	-	-	Q	-	-	V	-	-	-	-	-
A/Uruguay/04/2009	S	-	-	M	-	-	-	-	-	-	-	T	-	-	-	Q	-	-	V	-	-	-	-	-
A/Uruguay/05/2009	S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	-	-	-	Q	-	-	V	-	-	-	-	-
A/Uruguay/06/2009	S	-	N	-	-	-	-	-	-	-	-	T	-	-	-	Q	-	-	V	-	-	-	-	-
A/Uruguay/88/2011	S	-	N	-	-	-	Q	-	-	-	-	T	K	V	L	Q	-	-	V	-	A	K	R	-
A/Uruguay/90/2011	S	-	N	-	-	-	Q	G	-	-	-	T	K	V	L	Q	-	-	V	-	A	K	R	-
A/Uruguay/98/2011	S	-	N	-	-	-	Q	-	-	-	-	T	K	V	L	Q	-	-	V	-	A	K	R	-
A/Uruguay/117/2011	S	-	N	-	-	-	Q	G	-	-	-	T	K	V	L	Q	-	-	V	-	A	K	R	-
A/Uruguay/118/2011	S	-	N	-	-	-	Q	G	-	-	-	T	K	V	L	Q	-	-	V	-	A	K	R	-
A/Uruguay/141/2011	S	-	N	-	-	-	Q	-	-	-	-	T	K	V	L	Q	-	-	V	-	A	K	R	-
A/Uruguay/35/2011	S	-	N	-	-	-	Q	G	-	-	-	T	K	V	L	Q	-	-	V	-	A	K	R	-
A/Uruguay/154/2011	S	-	N	-	-	-	Q	-	-	-	-	T	K	V	L	Q	-	-	V	-	A	K	R	-
A/Uruguay/45/2011	S	-	N	-	-	-	Q	G	-	-	-	T	K	V	L	Q	-	-	V	-	A	K	R	-
A/Uruguay/92/2011	S	-	N	-	-	-	Q	-	-	-	-	T	K	V	L	Q	-	-	V	-	A	K	R	-
A/Uruguay/37/2011	S	-	N	-	-	-	Q	G	-	-	-	T	K	V	L	Q	-	-	V	-	A	K	R	-
A/Uruguay/113/2011	S	-	N	-	-	-	Q	G	-	-	-	T	K	V	L	Q	-	-	V	-	A	K	R	-
A/Uruguay/103/2011	S	-	N	-	-	-	Q	G	-	-	-	T	K	V	L	Q	-	-	V	-	A	K	R	-
A/Uruguay/112/2011	S	-	N	-	-	-	Q	G	-	-	-	T	K	V	L	Q	-	-	V	-	A	K	R	-
A/Uruguay/96/2011	S	-	N	-	-	-	Q	-	-	-	-	T	K	V	L	Q	-	-	V	-	A	K	R	-
A/Uruguay/108/2011	S	-	N	-	-	-	Q	-	-	-	-	T	K	V	L	Q	-	-	V	-	A	K	R	-
A/Uruguay/253/2013	S	-	N	-	-	-	-	Q	T	-	T	-	-	-	-	Q	T	E	V	-	-	K	-	N
A/Uruguay/254/2013	S	-	N	-	-	D	-	Q	T	-	T	-	-	-	-	Q	T	E	V	-	-	K	-	N
A/Uruguay/259/2013	S	-	N	-	-	-	-	Q	T	-	T	-	-	-	-	Q	T	E	V	-	-	K	-	N
A/Uruguay/271/2013	S	-	-	-	-	-	-	Q	T	-	T	-	-	-	-	Q	T	E	V	-	-	K	-	N
A/Uruguay/272/2013	S	G	-	-	-	-	G	I	T	T	T	K	-	-	-	Q	-	-	V	-	-	K	-	N

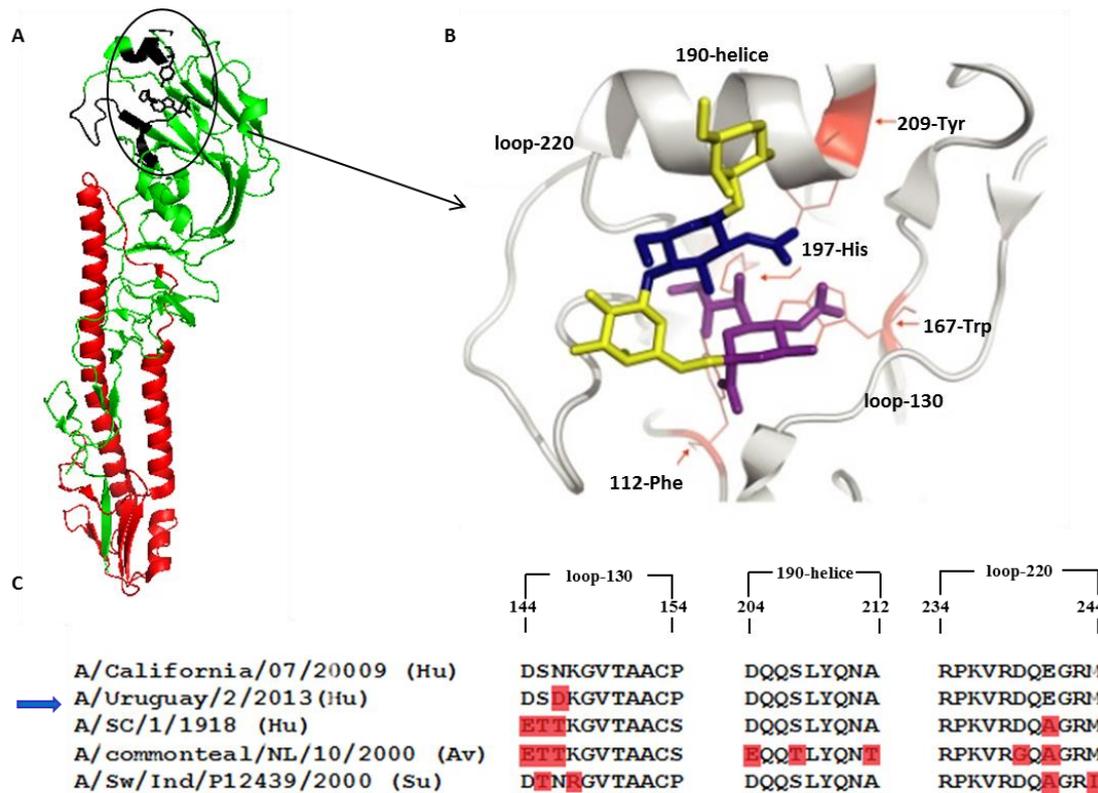
\* La identidad con la cepa vacunal A/California/07/2009 es indicada con un guion.

El alineamiento de las secuencias de aminoácidos de HA reveló que la gran mayoría de las sustituciones tuvieron lugar en la región HA1 de la HA (aminoácido 18 al 344). Sin embargo en la región HA2 (aminoácido 345 al 520), se han encontrado algunas sustituciones en cepas aisladas durante los años 2011 y 2013. Pudimos observar además, que todas las cepas uruguayas analizadas difieren de la cepa vacunal en cuatro posiciones, 100, 220, 240 y 338. Dos de las cuatro sustituciones involucraron un cambio en las propiedades fisicoquímicas del aminoácido. La sustitución P100S cambió de un aminoácido no polar (hidrofóbico) a uno polar y la sustitución R240Q cambió un aminoácido polar básico cargado positivamente por uno polar sin carga. Asimismo, observamos la existencia de sustituciones características para cada uno de los años estudiados.

Dado que la principal función de la HA es su participación en la unión al receptor celular, resultó interesante evaluar si existían sustituciones que generen cambios en la polaridad, estructura y carga eléctrica en la proteína ya que dichas sustituciones podrían afectar la función, así como también el reconocimiento de los anticuerpos neutralizantes.

Analizamos las posiciones de aminoácidos que forman parte de la región de unión al receptor y pudimos observar que ninguna de las muestras presentó sustituciones en los sitios conservados de dicha estructura, los cuales se pueden visualizar en la figura 14 A. Observamos además que todas las cepas analizadas poseen el aminoácido ácido aspártico en la posición 204 y en la posición 239 (D204 y D239), ambos localizados en el sitio de unión al receptor. Estas posiciones son las principales determinantes de la unión de la HA subtipo H1 al receptor humano permitiendo la transmisión eficiente del virus entre humanos [116], ver figura C.

Curiosamente, una de las muestras aislada en el año 2013 (A/Uruguay/254/2013), presentó una sustitución localizada en el loop 130. La sustitución fue de una asparagina por un ácido aspártico en la posición 146, N146D. Si bien se puede observar la existencia de distintas sustituciones en el loop 130 para las distintas cepas de Influenza, humanas, aviares y suinas, todos los cambios se dieron por aminoácidos de igual propiedad fisicoquímica. En el caso de la sustitución N146D, el cambio involucra un aminoácido polar sin carga por un aminoácido polar ácido cuya carga neta es negativa.



**Figura 14. Análisis del sitio de unión al receptor.** A. Estructura tridimensional de un monómero de HA, mostrando dos dominios HA1 en verde y HA2 en rojo, reflejando la estructura secundaria de hojas  $\beta$  y hélices  $\alpha$  y en negro la región involucrada en la unión al receptor. B. Representación del sitio de unión al receptor mostrando el loop 130, el 190 y el 220 y los residuos conservados Y98, W153, H183, y Y195 en complejo con un análogo al receptor humano LSTc en la conformación cis (PDB 2YP4) Extraído y adaptado de De Graaf & Fouchier, 2014. C. Alineamiento de secuencias de los aminoácidos de distintas cepas de Influenza A, aviares, humanas y suinas, analizando los sitios que se encuentra en el sitio de unión al receptor.

### 3.3.3.2 Mapéo de las sustituciones en HA

Además de la función en el reconocimiento celular y la fusión de membranas, la HA es el principal determinante antigénico contra el cual actúa el sistema inmune. Trabajos recientes han revelado la definición completa de los epítopes de las cepas A/H1 presentes en los virus A H1N1pdm, designados de la A-E o Sa, Sb, Ca1 y Ca2 y Cb [54, 112]. Cambios en estos sitios permiten generar variantes de escape y cuando estas sustituciones se fijan en la población provocan la deriva antigénica.

Con el objetivo de visualizar en que región de la proteína se localizaban los sitios donde ocurrieron las sustituciones en el segmento génico HA, se realizó el mapeo de los sitios utilizando el software PyMOL. Para ello, contamos con la estructura cristalográfica de la cepa A/California/04/2004 H1N1pdm (PDB: 3LZG), perteneciente

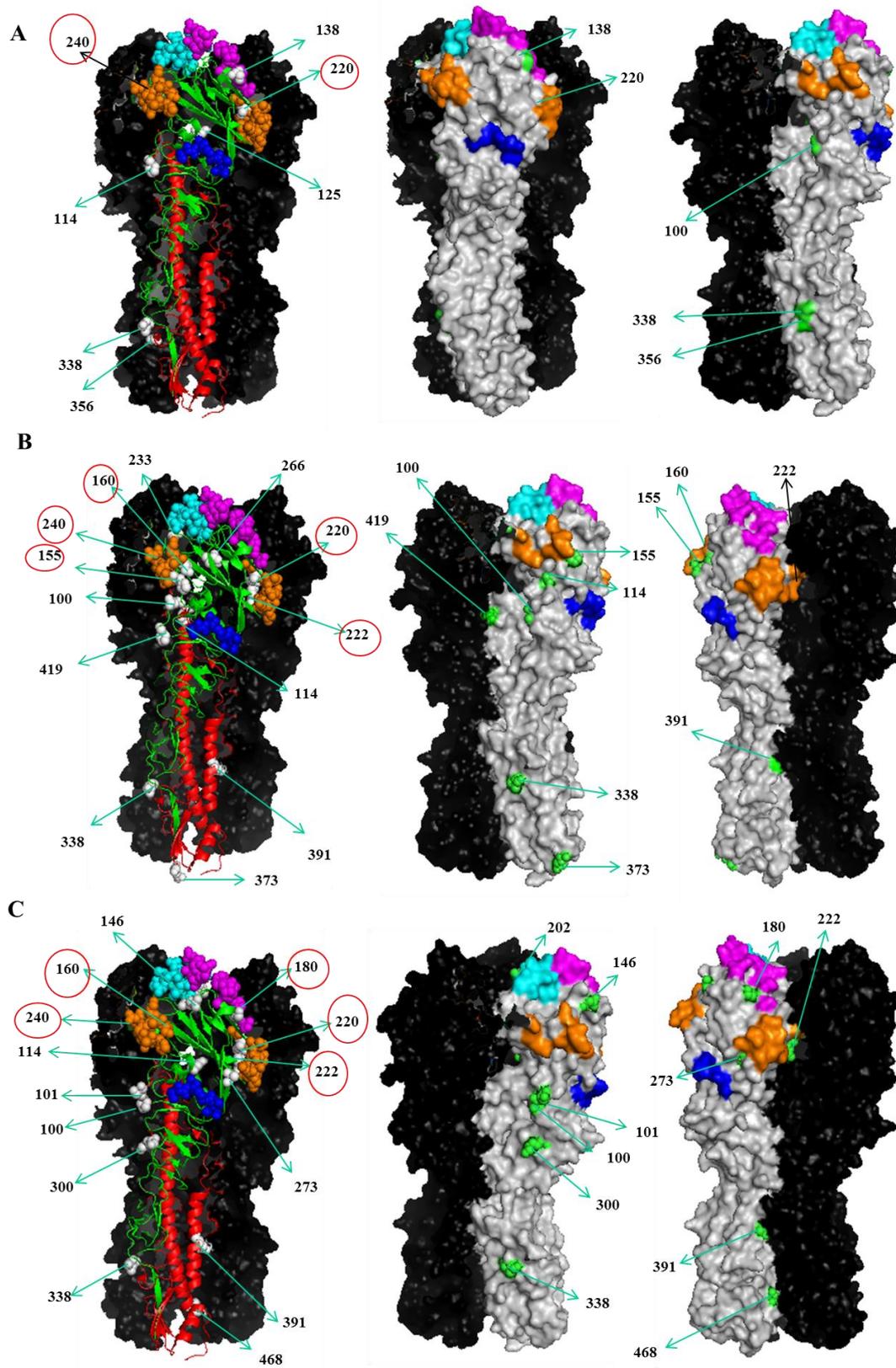
al clado 1 [117], la cual es muy similar del punto de vista estructural a la cepa vacunal recomendada para el hemisferio sur A/California/07/2009.

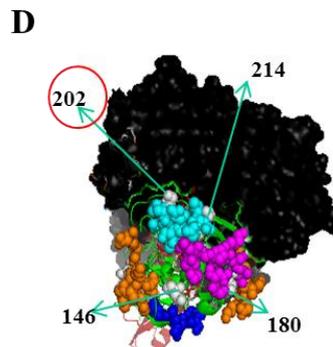
Los resultados de este análisis revelaron la existencia de diferentes variantes antigénicas. Pudimos observar un total de ocho cambios de aminoácidos localizados en diferentes sitios antigénicos para las muestras uruguayas. En el sitio antigénico Ca, se observó la sustitución S220T y R240Q en el 100% de las cepas, el cambio H155Q, S222L en el 100% de los aislados pertenecientes al año 2011, así como la sustitución S160G en el 90% pertenecían al 2011 y 10% de los aislados del 2013. Con respecto a el sitio antigénico Sa, se observaron dos sustituciones para las muestras del 2013, K180Q y K180I en un 80% y 10% respectivamente. Finalmente, se pudo observar para una única muestra del 2013, una sustitución que mapeó en el sitio antigénico Sb, la misma fue S202T. Si bien la mayoría de los cambios fueron por aminoácidos hidrofílicos, la sustitución S222L y K180I generó un cambio en la hidrofobicidad en esa posición, ya el aminoácido leucina (L) y isoleucina (I) son hidrofóbicos.

Por otro lado, identificamos una sustitución que si bien no mapeaba en ningún sitio antigénico, se localizó muy cerca del sitio antigénico Sb. Dicha sustitución (I233V) se observó en el 100% de las muestras del año 2011.

Las sustituciones en las posiciones 100, 114, 138, 356, 373, 391, 419, 101, 146, 214, 468, 273 y 300 mapearon en regiones expuestas de la proteína, lo cual es consistente con su naturaleza hidrofílica. Pudimos observar que los cambios en estas posiciones también involucraron un aminoácido hidrofílico (P100S, D114N, S138N, G356R, E391K, K419R, S101G, N146D, A214T, S468N, A273T y K300E), excepto en el caso de la posición 373, donde se dio un cambio de aminoácido hidrofílico a uno hidrofóbico E373A. Dicho cambio fue observado para las cepas aisladas durante el año 2011.

Por el contrario, los aminoácidos en las posiciones 125, 233 y 266 naturalmente hidrofóbicos fueron sustituidos por metionina, valina y leucina respectivamente, V125M (2009) y I233V, V266L (2011). El mapeo de estas sustituciones no evidenció una localización externa, ver figura 15 y anexo 1.





**Figura 15. Estructura tridimensional del homotrímero de HA mapeando sustituciones observadas para las cepas uruguayas.** En (A), las sustituciones encontradas en el 2009, en (B) las sustituciones encontradas en el 2011 y en (C) y (D) las sustituciones encontradas en el año 2013. Las figuras de la A-C muestran tres estructura tridimensional del homotrímero de HA, una de ellas muestra uno de los monómeros en su estructura secundaria (HA1 en verde y HA2 en rojo) y para resto de la proteína su estructura superficial en negro. Se representa con esferas blancas los átomos correspondientes a los aminoácidos sustituidos en los aislamientos estudiados. Se representa con esfera de diferentes colores los átomos correspondientes a los aminoácidos ubicados en los sitios antigénicos y con círculos aquellas posiciones donde ocurrieron cambios. En cian Sb, en violeta Sa, en naranja Ca1 y Ca2 y en azul Cb. A y C. Vista lateral, B. Vista frontal, D. Vista superior. Las demás estructuras se muestran en superficie, donde uno de los monómeros se indica en gris y los dos restantes en negro. En este caso se muestran en esferas verdes los átomos correspondientes a los aminoácidos sustituidos en los aislamientos estudiados.

### **3.3.3.3 Estudio de sustituciones en el segmento génico NA**

Con el objetivo de observar los cambios de aminoácidos que se generaron en el segmento génico NA en las cepas uruguayas durante los tres años de estudio y comparar éstas secuencias con la cepa vacunal (A/California/07/2009), procedimos a alinear las secuencias de NA con la cepa vacunal de la misma forma que se realizó para HA. El resultado de este análisis de muestra en la tabla 5.

**Tabla 5. Sustituciones de aminoácidos en el segmento génico NA de cepas uruguayas comparando con la cepa vacunal (A/California/07/2009).**

Cepas	70	106	123	136	144	185	200	217	241	248	278	296	299	301	321	339	351	369	382	386	388	397
A/California/07/2009	S	V	S	Q	H	H	N	K	V	N	E	W	S	R	I	S	Y	N	G	N	S	E
A/Uruguay/PF/2009	-	L	-	-	-	-	-	-	-	D	-	-	-	-	-	-	F	-	-	-	-	-
A/Uruguay/DR/2009	-	L	-	-	-	-	-	-	-	D	-	-	-	-	-	-	F	-	-	-	-	-
A/Uruguay/905/2009	-	L	-	-	-	-	-	-	-	D	-	-	-	-	-	-	F	-	-	-	-	-
A/Uruguay/890/2009	-	L	-	-	-	-	-	-	-	D	-	-	-	-	-	-	F	-	-	-	-	-
A/Uruguay/878/2009	-	L	-	-	-	-	-	-	-	D	-	-	-	-	-	-	F	-	-	-	-	-
A/Uruguay/856/2009	-	L	-	-	-	-	-	-	-	D	K	-	-	-	-	-	F	-	-	-	-	-
A/Uruguay/842/2009	-	L	-	-	-	-	-	-	-	D	-	-	-	-	-	-	F	-	-	-	-	-
A/Uruguay/835/2009	-	L	-	-	-	-	-	-	-	D	-	-	-	-	-	-	F	-	-	-	-	-
A/Uruguay/825/2009	-	L	-	-	-	-	-	-	-	D	-	-	-	-	-	-	F	-	-	-	-	-
A/Uruguay/815/2009	-	L	-	-	-	-	-	-	-	D	-	-	-	-	-	-	F	-	-	-	-	-
A/Uruguay/78/2009	-	L	-	-	-	-	-	-	-	D	-	-	-	-	-	-	F	-	-	-	-	-
A/Uruguay/76/2009	-	L	-	-	-	-	-	-	-	D	-	-	-	-	-	-	F	-	-	-	-	-
A/Uruguay/70/2009	-	L	-	-	-	-	-	-	-	D	-	-	-	-	-	-	F	-	-	-	-	-
A/Uruguay/689/2009	-	L	-	-	-	-	-	-	-	D	-	-	-	-	-	-	F	-	-	-	-	-
A/Uruguay/61/2009	-	L	-	-	-	-	-	-	-	D	-	-	-	-	-	-	F	-	-	-	-	-
A/Uruguay/605/2009	-	L	-	-	-	-	-	-	-	D	-	-	-	-	-	-	F	-	-	-	-	-
A/Uruguay/58/2009	-	L	-	-	-	-	-	-	-	D	-	-	-	-	-	-	F	-	-	-	-	-
A/Uruguay/57/2009	-	L	-	-	-	-	-	-	-	D	-	-	-	-	-	-	F	-	-	-	-	-
A/Uruguay/549/2009	-	L	-	-	-	-	-	-	-	D	-	-	-	-	-	-	F	-	-	-	-	-
A/Uruguay/518/2009	-	L	-	-	-	-	-	-	-	D	-	-	-	-	-	-	F	-	-	-	-	-
A/Uruguay/5/2009	-	L	-	-	-	-	-	-	-	D	-	-	-	-	-	-	F	-	-	-	-	-
A/Uruguay/495/2009	-	L	-	-	-	-	-	-	-	D	G	-	-	-	-	-	F	-	-	-	-	-
A/Uruguay/479/2009	-	L	-	-	-	-	-	-	-	D	-	-	-	-	-	-	F	-	-	-	-	-
A/Uruguay/39/2009	-	L	-	-	-	-	-	-	-	D	-	-	-	-	-	-	F	-	-	-	-	-
A/Uruguay/369/2009	-	L	-	-	-	-	-	-	-	D	-	-	-	-	-	-	F	-	-	-	-	-
A/Uruguay/345/2009	-	L	-	-	-	-	-	-	-	D	-	-	-	-	-	-	F	-	-	-	-	-
A/Uruguay/323/2009	-	L	-	-	-	-	-	-	-	D	-	-	-	-	-	-	F	-	-	-	-	-
A/Uruguay/319/2009	-	L	-	-	-	-	-	-	-	D	-	-	-	-	-	-	F	-	-	-	-	-
A/Uruguay/18/2009	-	L	-	-	-	-	-	-	-	D	-	-	-	-	-	-	F	-	-	-	-	-
A/Uruguay/11/2009	-	L	-	-	-	-	-	-	-	D	-	-	-	-	-	-	F	-	-	-	-	-
A/Uruguay/123/2009	-	L	-	-	-	-	-	-	-	D	-	-	-	-	-	-	F	-	-	-	-	-
A/Uruguay/01/2009	-	I	-	-	-	-	-	-	-	D	-	-	-	-	-	-	F	-	-	-	-	-
A/Uruguay/03/2009	-	I	A	-	-	-	-	-	-	D	-	-	-	-	-	-	F	-	-	-	-	-
A/Uruguay/04/2009	-	I	-	-	-	-	-	-	-	D	-	-	-	-	-	-	F	-	-	-	-	-
A/Uruguay/06/2009	-	I	-	R	D	Q	-	-	-	D	-	-	-	-	-	-	F	-	-	-	-	-
A/Uruguay/88/2011	-	I	-	-	-	-	-	-	-	D	-	-	-	-	-	-	F	-	-	-	-	-
A/Uruguay/90/2011	I	I	-	-	-	-	-	-	-	D	-	-	A	-	-	-	F	S	-	-	-	-
A/Uruguay/98/2011	-	I	-	-	-	-	-	-	-	D	-	-	A	-	-	-	F	S	-	-	-	-
A/Uruguay/117/2011	-	I	-	-	-	-	-	-	-	D	-	-	A	-	-	-	F	S	-	-	-	-
A/Uruguay/118/2011	-	I	-	-	-	-	-	-	-	D	-	-	A	-	-	-	F	S	-	-	-	-
A/Uruguay/141/2011	-	I	-	-	-	-	-	-	-	D	-	-	A	-	-	-	F	S	-	-	-	-
A/Uruguay/35/2011	-	I	-	-	-	-	-	-	-	D	-	-	-	-	-	-	F	S	-	-	-	-
A/Uruguay/154/2011	-	I	-	-	-	-	-	-	-	D	-	-	A	-	-	-	F	S	R	-	-	-
A/Uruguay/45/2011	-	I	-	-	-	-	-	-	-	D	-	-	A	-	-	-	F	S	-	-	-	-
A/Uruguay/92/2011	-	I	-	-	-	-	-	-	-	D	-	-	A	-	-	-	F	S	-	-	-	-
A/Uruguay/37/2011	-	I	-	-	-	-	-	-	-	D	-	-	A	-	-	-	F	S	-	-	-	-
A/Uruguay/113/2011	-	I	-	-	-	-	-	-	-	D	-	-	A	-	-	-	F	S	-	-	-	-
A/Uruguay/103/2011	-	I	-	-	-	-	-	-	-	D	-	-	-	G	-	-	F	S	-	-	-	-
A/Uruguay/48/2011	-	I	-	-	-	-	-	-	-	D	-	-	-	-	V	-	F	S	-	-	-	-
A/Uruguay/112/2011	-	I	-	-	-	-	-	-	-	D	-	-	A	-	V	-	F	S	-	-	-	-
A/Uruguay/96/2011	-	I	-	-	-	-	-	-	-	D	-	-	A	-	-	-	F	S	-	-	L	-
A/Uruguay/108/2011	-	I	-	-	-	-	-	-	-	D	-	-	A	-	-	-	F	S	-	D	-	-
A/Uruguay/253/2013	-	-	-	-	-	S	R	I	D	-	-	-	-	-	V	-	F	K	-	-	-	K
A/Uruguay/259/2013	-	-	-	-	-	S	R	I	D	-	-	-	-	-	V	-	F	K	-	-	-	K
A/Uruguay/254/2013	-	-	-	-	-	S	R	I	D	-	-	-	-	-	V	-	F	K	-	-	-	K
A/Uruguay/271/2013	-	-	-	-	-	S	R	I	D	-	-	-	-	-	V	-	F	K	-	-	-	K
A/Uruguay/272/2013	-	-	-	-	-	S	R	I	D	-	-	-	-	-	L	F	K	-	-	-	-	K

\* La identidad con la cepa vacunal A/California/07/2009 es indicada con un guion.

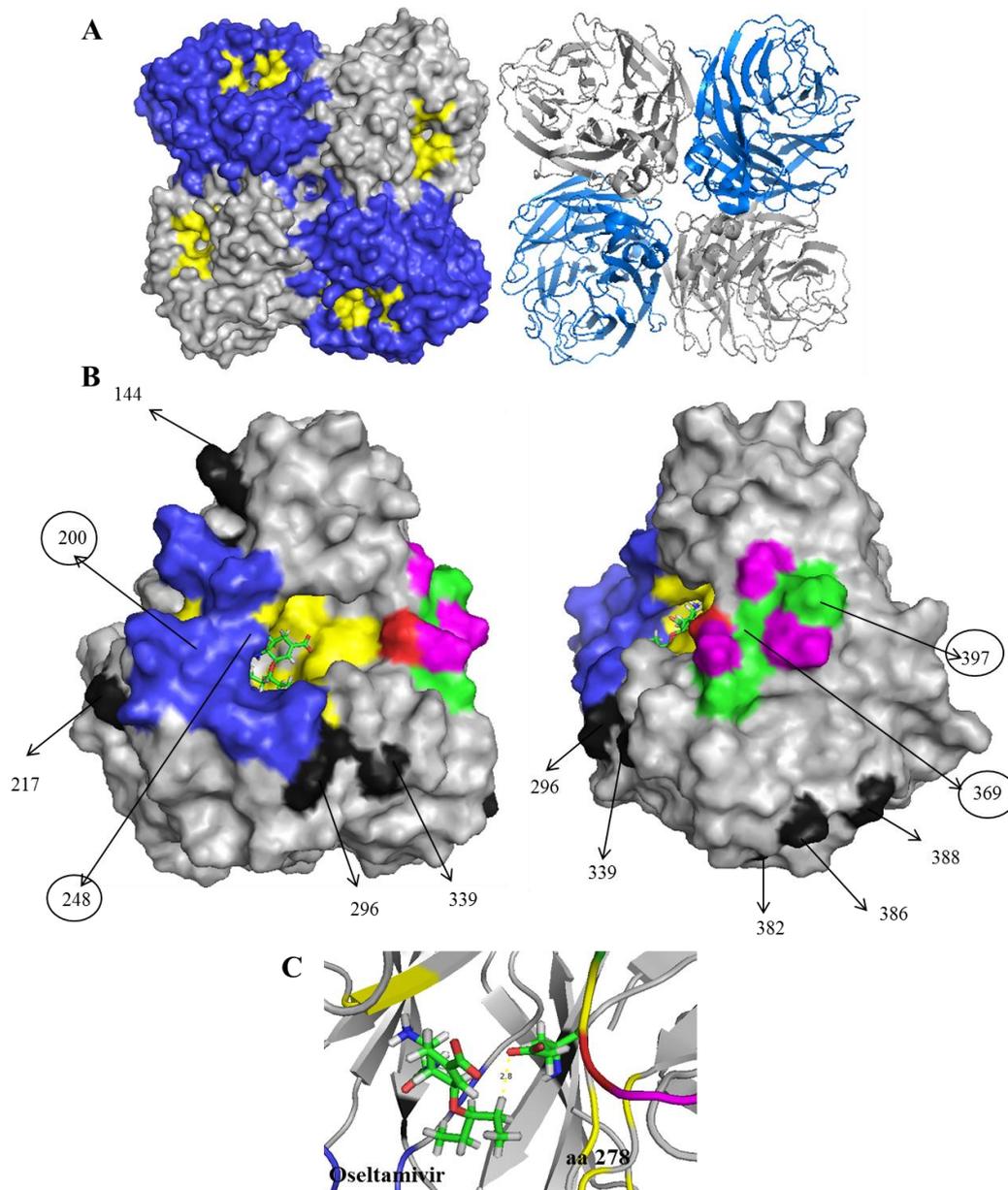
Con respecto a las sustituciones encontradas en el segmento NA, pudimos observar que todas las secuencias de este estudio fueron diferentes a la cepa vacunal A/California/07/2009 en las siguientes sustituciones a nivel de aminoácidos, N248D y Y351F. Al igual que en HA, detectamos sustituciones características en NA para cada uno de los años estudiados. La mayoría de las cepas aisladas en el año 2011 comparten la sustitución S299A y N369S, mientras que las muestras del año 2013 comparten las sustituciones N200S, K217R V241I, I231V, N369K y E397K.

#### **3.3.3.4 Mapeo de las sustituciones en NA**

Al igual que en el caso de HA, se analizó en que región de la proteína NA se localizaban las sustituciones de aminoácidos encontradas para las cepas uruguayas. De esta forma se estudió la posible cercanía de dichas sustituciones con el sitio activo de la enzima y considerando que la proteína NA es el segundo principal determinante antigénico del virus, evaluamos también si alguna de las sustituciones se encontraba en alguno de los sitios antigénicos descritos. Una vez más utilizamos el software PyMOL y la estructura cristalográfica cuyo PDB fue 3B7Q.

El resultado de este estudio mostró que la mayoría de las sustituciones que ocurrieron en la proteína NA no se localizaron en la superficie de la proteína. Pudimos identificar además, cuatro sustituciones en diferentes sitios antigénicos. La sustitución N248D se localizó en el sitio antigénico D, dicha sustitución se observó en todas las muestras analizadas. Asimismo, en el mismo sitio antigénico identificamos la sustitución N200S en las cepas del año 2013. Por otro lado la sustitución E397K observada en las cepas del año 2013 y las sustituciones N369K (2013) y N369S (2011), fueron localizadas en el sitio antigénico A, ver figura 16(B).

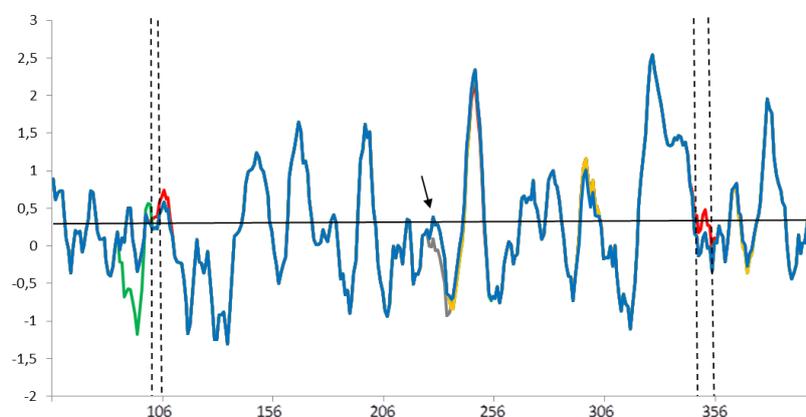
Finalmente, se midió la distancia en angstrom (Å) entre la molécula de Oseltamivir y las posiciones para las cuales se observaron sustituciones, de forma de inferir cuánto podrían afectar dichas sustituciones el sitio de unión a la droga. Mediante este abordaje se pudo observar que si bien la mayoría de los cambios no afectarían el sitio de unión al Oseltamivir, ya que se localizaron a más de 3Å de distancia, la sustitución en la posición 278 (E278K) se localizó a 2.6 Å de la molécula de Oseltamivir. Más aún, dicha sustitución implicó el cambio de un aminoácido ácido a uno básico, ver figura 16(C).



**Figura 16. Mapeo de sustituciones en la eestructura tridimensional de la NA.** En A, cada cadena polipeptídica del tetrámero se indica como estructuras de superficie de colores gris y azul. En amarillo se muestra el sitio de unión al receptor. En B, se muestran uno de los monómeros y en esferas negras los átomos correspondientes a los aminoácidos sustituidos en los aislamientos estudiados. El sitio activo de la enzima se muestra en amarillo y dentro de éste se observa la molécula de Oseltamivir. En colores se indican los sitios antigénicos A-D; A (verde), B (magenta), C (rojo) y D (azul). En C, se muestra la distancia en ángstrom entre el aminoácido de la posición 278 y la molécula de Oseltamivir.

### 3.3.3.5 Predicción de epítipes B

Con el objetivo de evaluar si las sustituciones de aminoácidos encontradas estarían afectando las propiedades antigenicas de la proteína NA. Nos propusimos estudiar los epítipes de células B en la molécula de NA. Para realizar este estudio utilizamos un dataset que contenía 146 secuencias aisladas en diferentes países de la región. De esta forma no solo evaluamos las sustituciones en nuestro país, sino que logramos obtener una visión mayor sobre la diversidad genética en la región sudamericana. Los resultados de este análisis se muestran en la figura 17.



**Figura 17. Predicción de epítipes de células B en la proteína NA.** En la figura se muestra la comparación entre la NA de la cepa vacunal para el año 2010-2013 A/California/07/2009 y las cepas aisladas en la región sudamericana. El BepiPred muestra el puntaje (score) en función de la posición de los aminoácidos a lo largo de la proteína. Los puntajes por encima del umbral 0.35 se muestran en una línea horizontal. Se muestra la comparación de los puntajes encontrados para la cepa vacunal (rojo), A/Argentina/07-09/2009 (marrón), A/Bahía/124/2009 (verde pálido), A/Para/110264/2012 (verde), A/Paraguay/138HCl/2009 (gris), A/Rio Grande do Sul/678/2012 (amarillo), y A/Uruguay/118/2011 (azul). La diferencia de epítipes en las posiciones 102-103 y 351-352 entre la cepa vacunal y las demás cepas se indican con líneas punteadas verticales. La diferencia entre la cepa vacunal y la cepa aislada en Paraguay en la posición 229 se indica con una flecha.

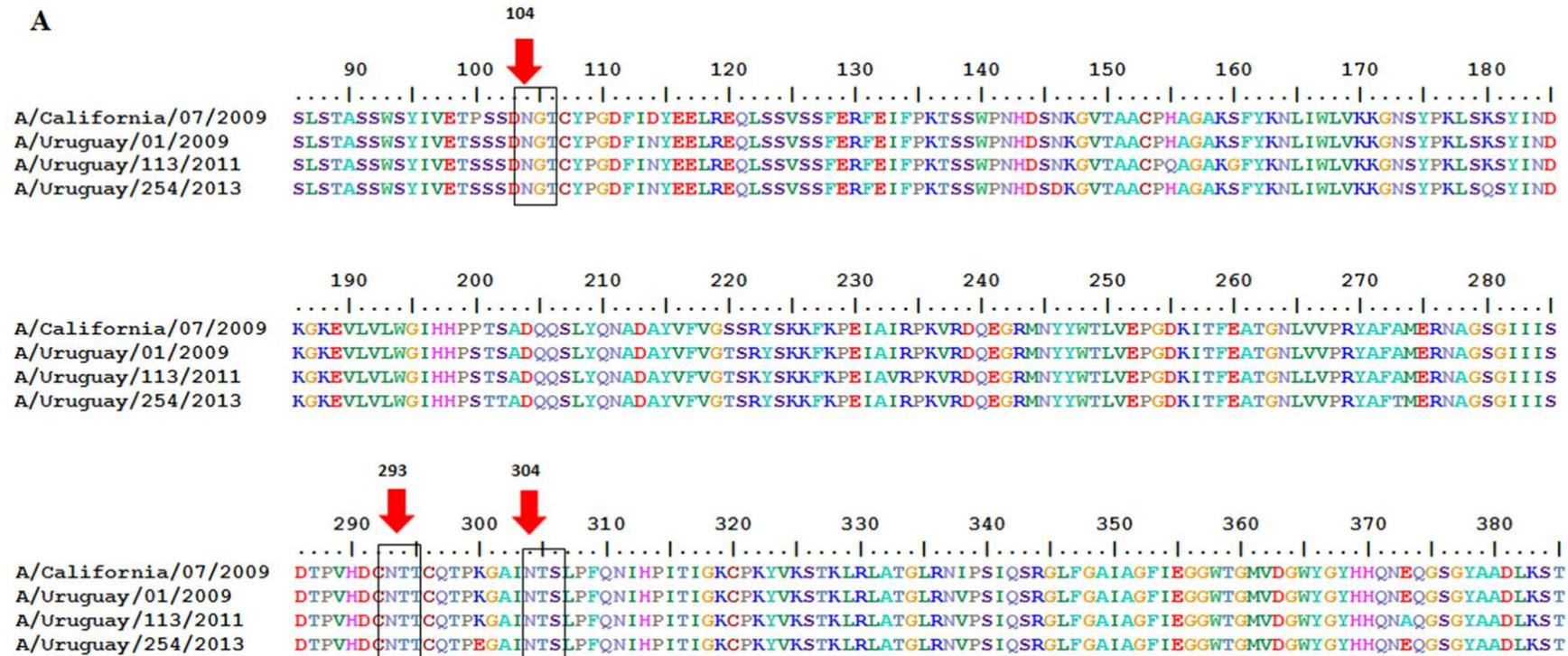
La presencia de un epítipo se muestra como un pico por encima del umbral de 0.35. La mayoría de las sustituciones encontradas en NA no mostraron una variación antigenica significativa con respecto a la cepa vacunal. Sin embargo, todas las cepas analizadas difieren de la cepa vacunal en dos regiones de epítipes cuya posición aminoacídica fue 102-103 y 351-352. Mas aún, las cepas aisladas en Paraguay difieren en un epítipo en la posición 229 con respecto a la cepa vacunal, ver figura 17.

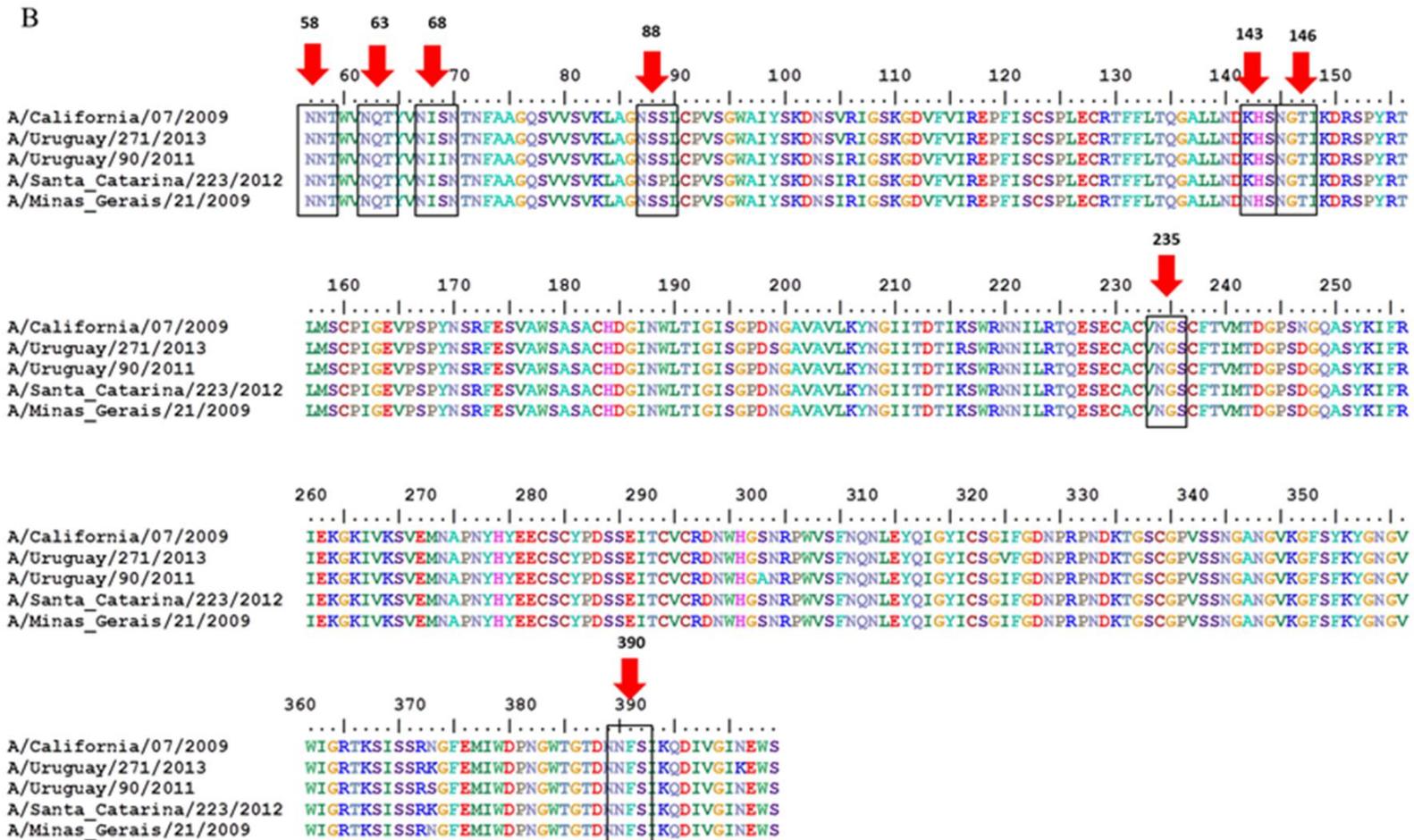
### **3.3.3.6 Análisis de potenciales sitios de Glicosilación**

Los patrones de glicosilación en las proteínas HA y NA pueden afectar las propiedades antigénicas, la especificidad y afinidad de unión al receptor y la virulencia [118, 119]. Por esta razón, analizamos los potenciales sitios de N-glicosilación para ambas proteínas mediante el servidor NetNGlyc 1.0.

Mediante esta aproximación logramos determinar que todas las secuencias HA analizadas comparten tres sitios de glicosilación conservados con la cepa vacunal y no se detectó presencia o ausencia de potenciales nuevos sitios para esta proteína. Con respecto a NA, todas las secuencias analizadas, comparten siete sitios de glicosilación conservados con la cepa vacunal. Sin embargo, observamos un nuevo sitio potencial de N-glicosilación en la posición 143 en una cepa aislada en Brasil (A/Minas Gerais/21/2009), así como también identificamos que ciertos sitios de N-glicosilación presente en la cepa vacunal no se encontraron en las cepas aisladas en Sudamérica. Dichos sitios se localizaban en las posiciones 68 y 88 de la cepa vacunal y no se encontraron en la una cepa aislada en Uruguay (A/Uruguay/90/2011) y una cepa aislada en Brasil (A/Santa Catarina/223/2012) respectivamente, ver figura 18.

A





**Figura 18. Potenciales sitios de glicosilación en HA y NA.** Los potenciales sitios de glicosilación identificados para cepas de Influenza A H1N1 pdm circulantes en la región sudamericana son señalados con flechas rojas. En A se muestra un alineamiento representativo del segmento génico HA de tres secuencias uruguayas, y en B se muestra un alineamiento representativo del segmento génico NA.

### **3.3.4 Estudio de la eficacia de la vacuna seleccionada para el hemisferio sur para el año (2009-2013)**

Si bien la vacunación es la manera más efectiva de reducir la morbilidad y mortalidad por el virus de la Influenza, la eficacia de la misma varía año a año, en parte debido a las distancias antigénicas entre las cepas circulantes y la cepa vacunal. Por este motivo se analizó la eficacia de la cepa vacunal entre los años 2009 y 2013, teniendo en cuenta que no se han realizado modificaciones en la composición vacunal. Para ello, se utilizó el método de p-epítotope el cual estima la eficacia teórica de la vacuna (E). Con los datos de nuestras secuencias calculamos la distancia antigénica entre la cepa vacunal y las cepas uruguayas de los distintos grupos filogenéticos identificados (Gr 7-pdm, Gr 5, Gr 6 y Gr 7), ver tabla 6.

**Tabla 6. Distancia aminoacídica para los cuatro grupos filogenéticos con respecto a la cepa vacunal A/California/07/2009.**

Grupos Filogenéticos	Número de secuencias	Año	P-epítotope	Eficacia de la vacuna (E)	Número de cambios en sitios antigénicos
G7 pdm S220T	14	2009	0,059	0,347	2
G5 D114N, R222K, I233V, V266L	17	2011	0,100	0,223	4 a 5
G6 D114N, S202T, S468N	4	2013	0,100	0,223	4
G7 S160G, A214T	1	2013	0,110	0,198	6

El presente estudio dio como resultado que entre los distintos grupos filogenéticos identificados en este período de tiempo, las cepas pertenecientes al grupo filogenético Gr 7-pdm, presentaron una mayor relación con respecto a la cepa vacunal, siendo el p-epítotope = 0.059 y por lo tanto una eficacia de 0.347. Para este grupo el epítotope dominante fue el epítotope E. Analizando las cepas del año 2011 y 2013, pudimos observar una disminución de la eficacia de la cepa vacunal. La comparación de la cepa vacunal con las cepas aisladas en el año 2011 Gr 5, reveló una eficiencia de 0.223. Asimismo, observamos que para este año el epítotope dominante pasó a ser el epítotope A. Al igual que lo observado para las cepas del Gr 5, la comparación de la cepa vacunal con aquellas pertenecientes al grupo filogenético Gr 6 el análisis de distancia antigénica mostró una eficacia vacunal de 0.223. Asimismo, pudimos observar una vez más el cambio de epítotope dominante, siendo en esta oportunidad el epítotope D. Finalmente la comparación de la cepa vacunal con el grupo definido como Gr 7 presentó el valor de eficiencia menor siendo esta de 0.198 y el epítotope dominante fue el E.

### 3.3.5 Determinar polimorfismos asociados a resistencia a antivirales

Con la finalidad de analizar la existencia de cepas resistentes a los NAIs durante los años 2009 y 2013, se estudió la presencia de cambios en aminoácidos característicos en el segmento génico NA asociados a la resistencia de estas drogas, tanto en cepas uruguayas como en cepas de la región. Para ello, se realizó un dataset con 343 secuencias correspondientes al segmento génico NA de muestras aisladas en Uruguay y en diferentes países de la región. Las sustituciones de aminoácidos para las cepas uruguayas se muestran en la figura 19 y el análisis para la región sudamericana se detalla en la tabla 7.

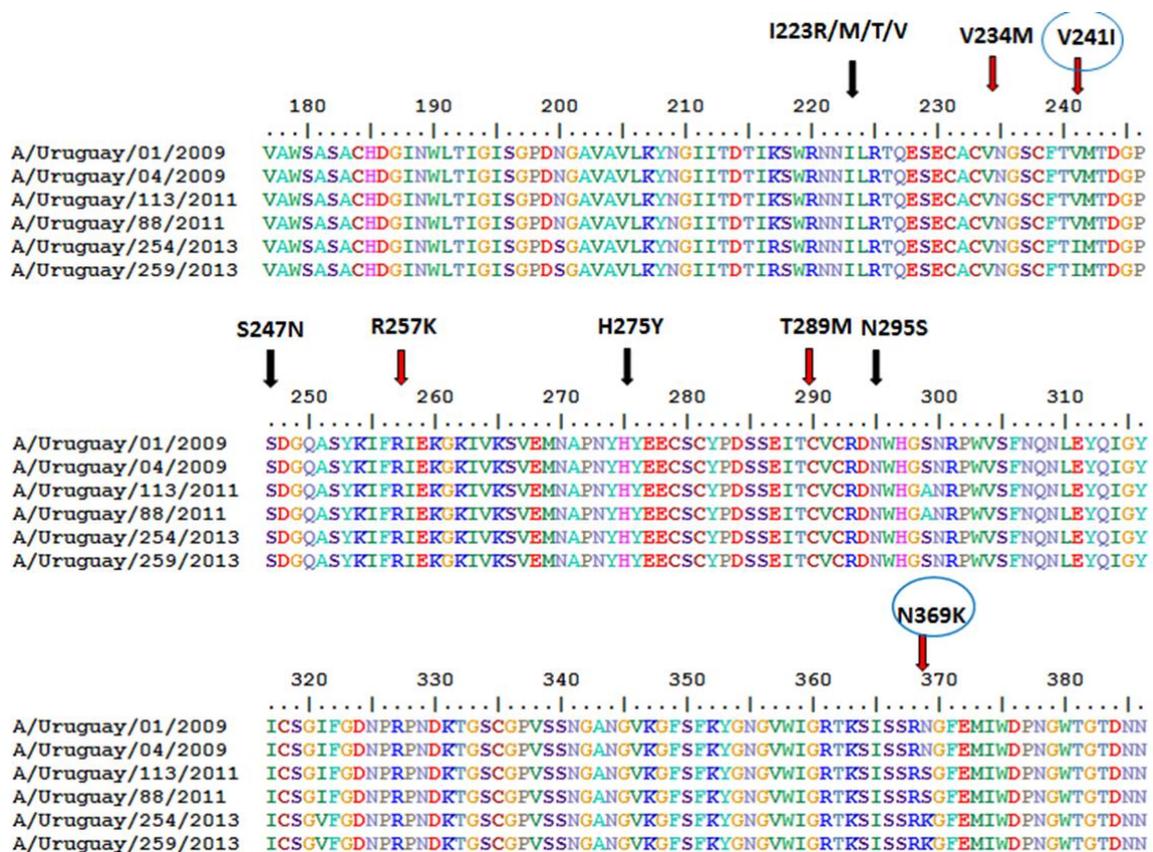


Figura 19. Alineamiento de secuencias aminoacídicas de NA de seis cepas representativas de Influenza A provenientes de Uruguay. Las cepas se muestran por su nombre a la izquierda de la figura. Los cambios aminoacídicos característicos en las posiciones 223, 247, 275 y 295 en la proteína NA, asociados a la resistencia a los NAIs se indican con flechas negras, mientras que aquellas sustituciones que aumentan el fitness viral de los virus resistentes H275Y se indican con flechas rojas. En círculos se indica las sustituciones detectadas en los virus aislados en Uruguay mediante secuenciación de Sanger.

**Tabla 7. Análisis de los polimorfismos asociados a la resistencia de los NAIs en la región Sudamericana.**

Sustitución aa	Año 2009 (n=124)	Año 2011 (n=54)	Año 2012 (n=93)	Año 2013 (n=72)
H275Y	2 (1,61%)	0	5 (5,4%)	1 (1,4%)
I223R	0	0	0	0
I223M	0	1 (1,85%)	0	0
I223V	0	0	0	0
I223T	0	0	0	0
S247N	0	1 (1,85%)	0	0
N295S	0	0	1 (1,8%)	0
V241I	0	30 (55,5%)	93 (100%)	62 (86,1%)
N369K	0	32 (59,3%)	93 (100%)	64 (88,0%)
R257K	0	0	0	0
T289M	0	0	0	0
V234M	0	0	0	0

Mediante el análisis de las secuencias consenso, no logramos identificar sustituciones asociadas a resistencia a los NAIs en las muestras uruguayas. Sin embargo, el análisis de las secuencias de NA de virus aislados en diferentes países de la región sudamericana permitió identificar la sustitución H275Y en muestras del año 2009, 2012 y 2013, siendo en el 88.8% de los casos, cepas aisladas en Brasil. Asimismo, se observaron las sustituciones I223M y S247N para dos muestras del año 2011 y la sustitución N295S en una muestra del año 2012.

En Uruguay, las sustituciones V241I y N369K se observaron para las muestras del año 2013. Sin embargo, dichas sustituciones ya estaban presentes en cepas circulantes en la región desde el año 2011.

### **3.4 Discusión Capítulo I**

En una primera instancia el trabajo se centró en obtener las secuencias de los segmentos génicos HA y NA, a partir de virus aislados de exudados nasales y aspirados naso-faríngeos de pacientes uruguayos (hospitalizados y ambulatorios) diagnosticados con enfermedad tipo Influenza (ETI), insuficiencia respiratoria aguda (IRA) e insuficiencia respiratoria aguda grave (IRAG), tomados en un período de tiempo que abarca el año 2009 al 2013. Utilizando protocolos previamente puestos a punto y primers diseñados en nuestro laboratorio, se procedió a la extracción de RNA, retrotranscripción y posterior amplificación por PCR en dos rounds. Como era de esperarse, no se obtuvo señal de amplificación en el gel de agarosa en el primer round de amplificación debido a la baja carga viral en las muestras clínicas. Una vez realizado el segundo round, se logró obtener amplificación del gen HA en un 93% de las muestras analizadas y de el gen NA en un 89% del total de muestras. Dichos resultados indican una gran eficiencia del método de amplificación utilizado. Con respecto a las muestras para las cuales no se logró obtener amplicón, las mismas presentaron altos valores de CTs, indicando baja carga viral. En el caso de la muestra 34 el CT fue de 35.71 y para la muestra 56 el CT fue de 37.73. Para el caso de la muestra 05 (2009) no contamos con los datos de CT.

La determinación de la diversidad de las cepas H1N1pdm es de gran importancia para poder entender la evolución y la dispersión de la pandemia, y de predecir el impacto futuro en las poblaciones humanas [59]. Con respecto a la dinámica filogenética de los virus Influenza A H1N1pdm estudios anteriores, basados en mutaciones específicas en el genoma viral, mostraron una temprana diversificación del virus en 7 clados o grupos filogenéticos que circularon en el periodo pandémico (G1, G2-pdm al G7-pdm) [66, 67]. El análisis filogenético realizado con el segmento génico HA de virus Influenza A H1N1pdm aislados de muestras clínicas durante el año 2009 al 2013 reveló la circulación de 4 grupos genéticos en Uruguay durante este período, ver figura 12(A) a 12(D).

En este estudio identificamos que todas las cepas aisladas en Uruguay, así como la mayoría de cepas aisladas en la región, pertenecían al clado 7 Gr 7-pdm. Las sustituciones aminoacídicas en la proteína HA que definen el clado 7 (P100S, S220T y I338V) se encontraron en todas las cepas sudamericanas, ver tabla 6. Ninguna de estas sustituciones se encuentra presente en la cepa vacunal A/California/7/2009, la cual pertenece al clado 1.

Asimismo, en el análisis filogenético de HA observamos que otros linajes habían circulado en la región durante el año 2009 (G7-pdm, G6-pdm y G5-pdm), así como la

co-circulación de linajes en países como Brasil, como ya había sido descrito previamente [72, 120, 121]. Actualmente aún no está claro si estas diferencias son debidas a la severidad clínica de cada caso o a la capacidad replicativa entre los linajes co-circulantes [66].

Al igual que se observó en otras regiones, el clado G7-pdm fue el más distribuido durante el periodo pandémico [66, 67]. La dominancia de este clado frente a los demás, se podría atribuir a su introducción inicial en la ciudad de Nueva York, lo que probablemente facilitó su rápida dispersión global debido a su alta interconexión internacional [122]. Aún queda por saber si esa predominancia se debe a una mejor capacidad replicativa del virus o se debe a una mejor transmisión del virus a humanos.

El fin de la pandemia fue declarado en agosto del año 2010 por la Organización mundial de la salud. En Uruguay no se reportaron casos de Influenza A H1N1 para el año 2010, esto podría deberse a la inmunidad rebaño generada por la campaña de vacunación masiva contra el virus pandémico en el año previo. Desde entonces, el virus ha circulado como un virus estacional junto al virus de Influenza A/H3N2 y dos linajes del virus Influenza B, causando epidemias anuales durante los meses de invierno, con un menor impacto en la morbilidad y mortalidad que durante el periodo pandémico.

En base al análisis del segmento génico HA de virus circulantes en el periodo post pandémico, se ha observado recientemente una nueva diversificación de este virus a partir del clado 7 o Gr 7-pdm, definiéndose nuevos grupos filogenéticos (G2 al G7, incluidos los subgrupos 6A al 6C). Más aún, las cepas que circularon en la temporada (2012-2013) del Gr 6 fueron clasificadas en distintos grupos 6A al 6C. Los virus del Gr 5, 6 y 7 fueron los más distribuidos en el mundo y poseen una combinación de sustituciones características D114N, R222K, I233V y V266L (Gr 5), D114N, S468N y S202T (Gr 6) y S160G, A214T y S541N (Gr 7) (WHO 2012a). El aumento en la diversidad de estos virus fue observada en países como Turquía, Japón, India y Túnez [123-126].

Los resultados del presente estudio indican que las cepas uruguayas y de la región sudamericana, aisladas en el periodo post pandémico, circularon en tres de estos nuevos grupos (Gr 5, Gr 6 y Gr 7), ver figura 12. Las cepas uruguayas que circularon durante el año 2011 pertenecían al Gr 5, mientras que en los años subsiguientes co-circularon cepas del Gr 6 y Gr 7. Analizando el árbol filogenético podemos observar que mientras las cepas del año 2012 pertenecieron al Gr 6A y Gr 6D, las que circularon en el año 2013 se agruparon con cepas del Gr 6B y 6C.

Estos resultados concuerdan con estudios recientes donde muestran la circulación durante la temporada 2011-2012 en Argentina de virus pertenecientes al Gr 5, Gr 6 y Gr 7 [127]. Al igual que en Uruguay, en Brasil durante el año 2011 circuló mayoritariamente virus pertenecientes al Gr 5 y para el año 2013 Gr 6 y Gr 7 [128]. En suma, a partir de la topología del árbol de máxima verosimilitud se aprecia una clara dinámica temporal de estas cepas, además de la co-circulación de grupos genéticos y subgrupos en un mismo período de tiempo, así como el remplazo de ciertos grupos a lo largo del tiempo.

Paralelamente, se estudió la variabilidad genética de los virus Influenza A H1N1pdm mediante un abordaje filogenético diferente en donde se consideró la información genética codificada en el segmento génica NA. Este estudio dio como resultado que todas las cepas aisladas en el año 2009 se agrupan juntas y las cepas aisladas en los distintos años se agrupan en cluster distintos. Asimismo, todas las cepas del año 2009 estaban más relacionadas genéticamente entre sí y mantienen cierta distancia genética con aquellas aisladas en el año 2011 y 2013. Además la cepa vacunal A/California/7/2009 fue genéticamente distante a todas las cepas de las tres temporadas estudiadas. Finalmente, este estudio evidenció la co-circulación de dos linajes genéticamente distintos en el año 2013 en Uruguay [129]. Estos resultados concuerdan con los obtenidos para el segmento génico HA, en el cual se identificó dos grupos filogenéticos circulando en el año 2013 (Gr 6 y Gr 7).

La proteína HA es el principal determinante antigénico del virus y es responsable además de la entrada del virus a la célula hospedadora. El análisis en el gen que codifica esta proteína es esencial a la hora de determinar patrones de virulencia, procesos de deriva antigénica, así como determinar la distribución geográfica y temporal de cepas virales [114].

Las suatutuciones K2E y Q293H han sido reportadas como potenciales marcadores de virulencia en los virus Influenza A H1N1pdm [67, 130]. Asimismo, la posición 239 (222 en H3) se encuentra en el sitio antigénico Ca2, cerca del sitio de unión al receptor, por lo que cualquier alteración podría afectar la especificidad de unión [128, 131]. Estudios recientes han reportado que la sustitución D239N/G/E potencia la unión a receptores ácido siálico unidos por enlaces  $\alpha$ 2-3, por tanto sugieren que virus con estas sustituciones tendrían una mayor habilidad para unirse a células de pulmón en el tracto respiratorio inferior en humanos, causando una enfermedad exacerbada [132, 133]. Asimismo, dicha sustitución fue relacionada a casos fatales [67, 130]. El análisis de la secuencia del gen HA obtenido por Sanger no evidenció la sustitución D239N/G/E en las muestras uruguayas.

Evaluamos aminoácidos conservados en la secuencia de HA que forman parte del sitio de unión al receptor y las tres estructuras secundarias conservadas que delimitan esta región [109, 110], ver figura 13c. Todas las cepas analizadas poseen el aminoácido ácido aspártico en la posición 204 y en la posición 239 (D204 y D239), localizados en el sitio de unión al receptor. Estas posiciones son las principales determinantes de la unión de la HA subtipo H1 al receptor humano [116] permitiendo la transmisión eficiente del virus entre los seres humanos. Sin embargo, una de las muestras aisladas en el año 2013 (A/Uruguay/254/2013), presentó una sustitución localizada en el loop 130. La sustitución fue de una asparagina por un ácido aspártico en la posición 146. Si bien se puede observar distintas sustituciones en el loop 130 para distintas cepas de Influenza, todos los cambios ocurren por aminoácidos de igual propiedad fisicoquímica, mientras que la sustitución N146D genera un cambio en la polaridad del aminoácido, de un aminoácido polar con carga neta cero a un aminoácido ácido cargado negativamente.

Teniendo en cuenta que la variabilidad antigénica de los virus de la Influenza A es la base de las epidemias recurrentes que ocurren cada año, consideramos que la caracterización de las variantes circulantes es de gran importancia a la hora de la formulación de la vacuna para la próxima temporada invernal, dado que la efectividad de la vacuna dependerá de cuán similares sean la cepa vacunal y la cepa circulante [134]. Mapeando las posiciones para las cuales se encontraron cambios de aminoácidos en HA, identificamos un aumento en el número de sustituciones relacionadas a diferentes sitios antigénicos, desde el año 2009 al 2013. En las muestras del año 2009 se identificaron dos cambios con respecto a a cepa vacunal, en las muestras del año 2011 de cuatro a cinco cambios y para las cepas del año 2013, seis cambios fueron observados. El aumento en el número de sustituciones en la porción globular de la proteína HA (HA1), observada en los virus que circularon en el periodo post pandémico ha sido sugerido como un mecanismo de evasión de la respuesta inmune del hospedero [135].

Identificamos una sustitución que si bien no mapeaba en ningún sitios antigénicos, se localizó muy cerca del sitio Sb. Dicha sustitución, I233V, involucró un cambio de aminoácido de igual naturaleza hidrofóbica, por lo cual no creemos que produzca grandes cambios a nivel proteico, ni en el sitios antigénicos cercano. Por otro lado, algunas posiciones no mapearon en sitios antigénicos, pero se encontraron en regiones externas de la proteína, lo cual es consistente con su naturaleza hidrofílica, excepto la sustitución E373A. Si bien ésta sustitución se visualizó en una región externa, el cambio involucró un aminoácido hidrofílico. Probablemente el modelado

de dicha sustitución revelaría su verdadera posición. Por el contrario, aquellas posiciones con aminoácidos hidrofóbicos no mostraron una localización externa y posiblemente estén ubicados en regiones de contacto con las otras subunidades del homotrímero, o bien en una región interna de la proteína.

Al igual que en HA, se analizó en que región de la proteína NA se localizaban las sustituciones de aminoácidos encontradas en las cepas uruguayas. Se estudió la posible cercanía de dichas sustituciones con el sitio activo de la proteína y considerando que la proteína NA es el segundo principal determinante antigénico del virus evaluamos también, si alguna de las sustituciones involucraba algún sitio antigénico.

Al igual que lo observado para HA, la mayoría de las sustituciones en la proteína NA se localizaron en la superficie de la proteína en concordancia con estudios previos [72, 136]. Pudimos identificar además, cuatro sustituciones en diferentes sitios antigénicos. Se pudo observar que si bien la mayoría de los cambios no afectarían el sitio de unión al Oseltamivir ya que se localizaron a más de 3Å de distancia, la sustitución en la posición 278 (E278K) se localizó a 2.6 Å. Más aún, dicha sustitución implicó el cambio de un aminoácido ácido a uno básico, ver figura 15(C).

De forma de observar si en las sustituciones que ocurrieron en la NA podrían afectar las propiedades antigénicas de la proteína, se realizó un estudio con el fin de predecir epítopes de células B de la cepa vacunal A/California/7/2009 y las cepas aisladas en la región. Pudimos determinar que las cepas aisladas en Sudamérica difieren de la cepa vacunal en dos regiones que fueron predicha como epítopes, la cuales se encontraron en las posiciones 102–103 y 351–352. Además se pudo observar que una cepa aislada en Paraguay difería en un epítope presente en la cepa vacunal. Estos resultados sugieren que posiblemente estos epítopes no estén presentes en las cepas analizadas.

Tanto HA como NA son glicoproteínas y por tanto tienen la capacidad de unirse a azúcares por medio de enlaces N-glicosídicos. Los residuos de azúcares se unen a aminoácidos asparagina (Asn) conservados dentro de un motivo de secuencia (Asn-X-Ser/Thr), donde X representa cualquier aminoácido. Dadas las características antigénicas de ambas proteínas, muchas veces los azúcares expresados en la superficie proteica protegen o modifican los sitios antigénicos como forma de evadir los anticuerpos neutralizantes. Dichos azúcares pueden afectar también la especificidad de unión al receptor, la virulencia, así como las propiedades biológicas de ambas proteínas [118, 119]. Es por este motivo, que nos interesó evaluar los sitios de glicosilación en las cepas uruguayas y de la región. Realizamos la predicción de estos

sitios utilizando el servidor NetNGlyc 1.0 y pudimos determinar un potencial sitio de glicosilación en una de las cepas aisladas en Brasil, y la ausencia de dos potenciales sitios de glicosilación en una cepa uruguaya y una brasilera, posiblemente generado como parte de un mecanismo de evasión a la respuesta inmune [118].

Mediante el análisis filogenético pudimos observar que las secuencias de las muestras tomadas en los años post pandémicos tenían una mayor distancia genética que las cepas pandémicas con respecto a la cepa vacunal. El cálculo de la distancia antigénica entre la cepa vacunal y las cepas pertenecientes a cada uno de los grupos filogenéticos reveló una tendencia a la disminución en la eficacia teórica de la vacuna a lo largo de los años. Asimismo se pudo determinar que el epítotope dominante fue cambiando a lo largo de los años. Los resultados obtenidos usando la teoría de p epítotope revelan que más estudios son necesarios para poder ver la eficacia de la vacuna entre la cepa vacunal y las cepas circulantes y poder comprender las reglas por las cuales la evolución antigénica ocurre en los virus de la Influenza A y de esta forma contribuir al diseño de vacunas más efectivas [137].

La vigilancia de la emergencia de cepas de virus Influenza resistentes a los antivirales es de gran importancia tanto para tener un control global de las cepas circulantes como para mantener el uso adecuado de los mismos durante las infecciones por virus Influenza. Dado que los virus Influenza H1N1pdm son resistentes a los adamantanos, los NAIs han sido las principales drogas utilizadas, entre ellos, el Oseltamivir ha sido ampliamente utilizado desde la última pandemia. En consecuencia, la presión impuesta por aumento en el uso de esta droga, ha permitido seleccionar variantes resistentes, con una prevalencia de entre el 1 al 2% en diferentes países [104, 138], haciendo esencial el monitoreo de las cepas circulantes.

Mediante la información obtenida por la secuenciación de Sanger no detectamos las sustituciones H275Y, N295S, S247N ni los polimorfismos en la posición 223 en las muestras uruguayas, asociadas a casos de resistencia al Oseltamivir en virus Influenza H1N1 [90-92, 103, 139, 140]. Sin embargo, diversos estudios han reportado casos de resistencia al oseltamivir en la región sudamericana [140, 141]. En concordancia con estos reportes, cuando analizamos un total de 343 secuencias de NA de toda la región sudamericana pudimos detectar la sustitución H275Y en muestras del año 2009, 2012 y 2013, siendo en el 88.8% de los casos, cepas aisladas en Brasil y el resto de Argentina. Asimismo, se observó las sustituciones I223M y S247N para dos muestras del año 2011 y la sustitución N295S en una muestra del año 2012.

La transmisión de virus resistentes H275Y, ha llamado la atención, ya que como mencionamos en la introducción la mutación H275Y tiene un efecto perjudicial en la capacidad replicativa del virus en ausencia de Oseltamivir. Sin embargo, esto puede

ocurrir ya que el virus puede adquirir sustituciones en su genoma que compensan el efecto negativo de la sustitución H275Y [95, 105, 106]. Este tipo de virus con mutaciones permisivas, han circulado en la población y podrían haber sido responsables de los brotes de resistencia reportados en distintas comunidades [142, 143]. Es interesante notar que muchas de estas sustituciones fueron observadas en las muestras uruguayas, así como también en cepas de la región. Particularmente las sustituciones V241I y N369K emergieron en Uruguay en el año 2013, aún estando presente en gran parte de las cepas circulantes de la región desde el año 2011. Estos resultados muestran la potencial emergencia de virus resistentes a los INAs, ya que una vez que ocurra la sustitución en la posición 275, la población viral circulante ya cuenta con las sustituciones compensatorias que participan en este efecto epistático.

**4. Capítulo II: Análisis la dinámica  
poblacional de variantes virales de gripe A  
H1N1 entre los años 2009 al 2013  
mediante secuenciación masiva**

#### **4.1 Objetivo general Capítulo II**

Análizar la dinámica poblacional de variantes virales de gripe A H1N1 entre los años 2009 al 2013 mediante secuenciación masiva.

##### **Objetivos específicos**

Construcción de librerías y secuenciación masiva.

Establecer la diversidad genética del virus Influenza A H1N1pdm mediante el análisis de variantes minoritarias para el segmento génico HA y NA

Detectar variantes asociadas a resistencia a los antivirales

## **4.2 Materiales y métodos Capítulo II**

Para el análisis mediante secuenciación masiva fueron seleccionadas dos muestras clínicas correspondientes a cada uno de los años estudiados, muestra 01 y 04 (2009), 88 y 113 (2011) y 254 y 259 (2013).

La secuenciación masiva fue realizada en la plataforma de secuenciación del Instituto Pasteur de Montevideo. Para la preparación de muestras se utilizó el kit Nextera XT DNA Sample Preparation Kit (Illumina). La corrida de secuenciación se realizó en el aparato MiSeq de Illumina.

### **4.2.1 Cuantificación del DNA purificado**

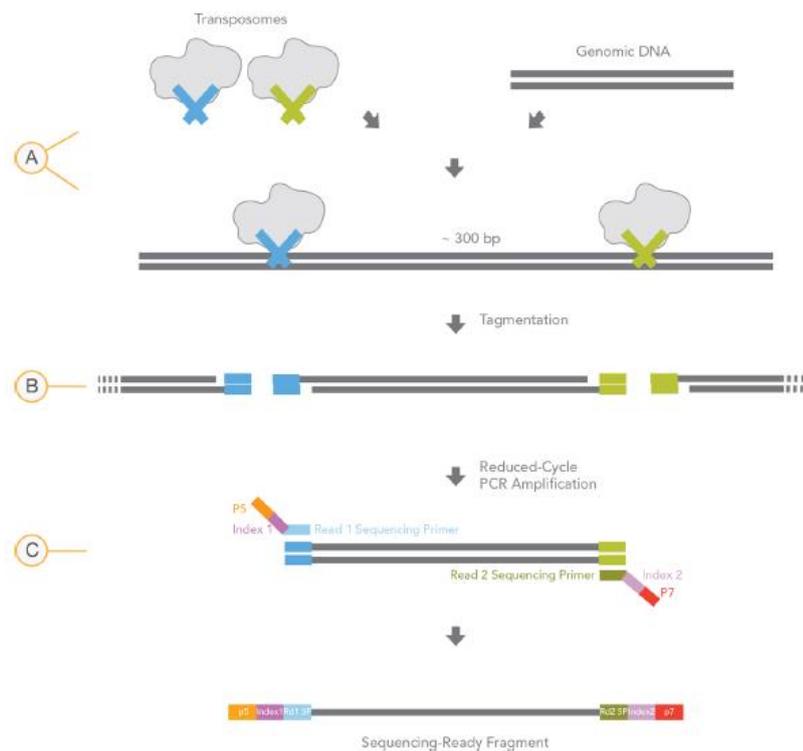
El éxito del ensayo depende fuertemente de la cuantificación exacta del DNA input para cada librería. El kit Nextera requiere de una concentración de DNA inicial (input) de 1ng/μl. Por tanto, los productos de PCR purificados fueron cuantificados mediante el fluorómetro Qubit 2.0, utilizando el kit Labeling detection Qubit dsDNA BR Assay System (Life technologies), el cual incorpora un agente intercalante fluorescente de unión específica al DNA doble hebra.

El equipo es calibrado con dos estándares de concentración y para la medida de cada muestra se utilizó 1μl de DNA y la solución de trabajo del Qubit (fluoróforo y solución tampón) en una dilución 1/200. También se preparó un estándar con 190μl de la mezcla de trabajo con 10μl del estándar. El DNA de todos los amplicones se llevaron a 0.2ng/μl y finalmente se emplearon 5μl como DNA input para la preparación de las librerías.

### **4.2.3 Construcción de librerías:**

#### **4.2.3.1 Fragmentación y purificación de DNA por cuentas magnéticas (magnetic beads)**

El DNA debe de ser fragmentado para la preparación de las librerías. Durante la fragmentación por parte de la enzima transposasa (cada 300pb aproximadamente) se unieron fragmentos adaptadores a los extremos, el cual permite el siguiente paso de amplificación por PCR. Durante la etapa de amplificación se añadieron primers que hibridaron con los adaptadores de cada fragmento. Dicho procedimiento se representa en la figura 20. Luego de la amplificación por PCR, se purificó el DNA usando cuentas magnéticas. Tanto para la fragmentación, la amplificación por PCR, como para la purificación se siguieron las instrucciones suministradas por del fabricante.



**Figura 20. Diagrama de la construcción de librerías utilizando el kit Nextera XT DNA Sample Preparation Kit.** En A la transposasa del kit con adaptadores es combinada al DNA doble hebra. En B se muestra el paso de tagmentación de cada fragmento y la unión con los adaptadores. En C se muestra la unión de primers e índices que hibridaron con los adaptadores de cada fragmento (Extraído y adaptado de [Nextera DNA Library Preparation Kits Data Sheet](#)).

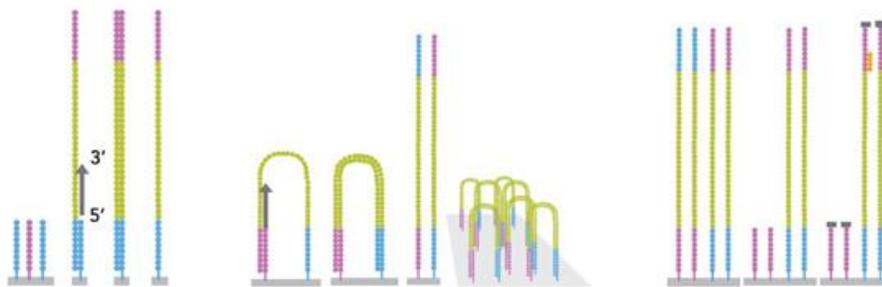
#### **4.2.3.2 Cuantificación y control de calidad y tamaño de las librerías**

El análisis de calidad y cuantificación de las librerías purificadas se realizó mediante el aparato Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies).

#### **4.2.4 Secuenciación Masiva**

Para la secuenciación se utilizó el equipo MiSeq (Illumina) y en esta etapa se combinaron volúmenes iguales de cada una de las librerías normalizadas, se diluyeron en buffer de hibridación y se desnaturalizaron por calor para ser cargadas en el cartucho de secuenciación. Durante la etapa de secuenciación, los adaptadores de cada fragmento se hibridaron con primers universales unidos a un panel (flow cell) y de esta forma se generaron clusters clonales de amplificación. El DNA fue sintetizado desde la zona de unión mediante la extensión del extremo 3' utilizando una enzima de alta fidelidad. Durante esta etapa la polimerasa copia del DNA hibridado formando

puentes de DNA doble hebra que son desnaturalizados en forma de dos cadenas simples. Cada una de las cadenas hibridan nuevamente con otros primers y son extendidas para formar loops de DNA doble hebra. Este proceso se repite para cada molécula mediante numerosos ciclos de desnaturalización y amplificación, de forma de obtener millones de clusters clonales con aproximadamente 2000 copias de la molécula molde. Posteriormente los primers de secuenciación se hibridan a su secuencia complementaria en los extremos libres de la secuencia molde de los clusters para comenzar el proceso de secuenciación. La secuenciación permite la secuenciación masiva y paralela de millones de fragmentos utilizando un método de terminadores fluorescentes reversibles que detectan a cada base incorporada en la cadena naciente de DNA. Los terminadores son removidos luego de la detección de cada base permitiendo que el proceso de secuenciación se extienda ciclicamente hasta 100 veces. En la figura 21 se muestran los pasos mencionados anteriormente.



**Figura 21. Representación de la PCR tipo puente y las primeras etapas de secuenciación.** A. Unión de los fragmentos de DNA a los primers, B. Amplificación por puente para generación de clusters, C. Desnaturalización de la molécula de DNA doble hebra, D Clivaje y remoción de los fragmentos reversos, E. Unión covalente de las hebras directas del cluster a los primers de secuenciación y comienzo de la secuenciación. (Extraído y adaptado de [Nextera DNA Library Preparation Kits Data Sheet](#)).

#### **4.2.5 Obtención de secuencias y análisis**

Las secuencias correspondientes a cada muestra fueron discriminadas por la combinación de primers que se utilizó en la corrida (índices o index). Los datos de cada corrida se analizaron mediante el programa MiSeq Reporter integrado al secuenciador MiSeq y nos quedamos con aquellas secuencias que superaron los filtros de calidad y cobertura del aparato en forma de fastq. Los datos de secuenciación masiva fueron analizados mediante el programa Viral Variance Analysis (ViVan). Dicho programa permite identificar, caracterizar y comparar variantes genéticas dentro de las poblaciones virales. Además aporta información adicional sobre la diversidad poblacional, como cambios sinónimos y no sinónimos, y las tasas de

transición/transversión para cada muestra analizada [41]. Las secuencias consenso de cada segmento génico fueron inferidas a partir de los nucleótidos representados en mayor frecuencia en cada posición.

## **4.3 Resultados Capítulo II**

### **4.3.1 Primera caracterización de variantes virales de VIA H1N1pdm mediante secuenciación masiva.**

#### **4.3.1.1 Construcción de librerías y secuenciación por síntesis**

Para el análisis mediante secuenciación masiva fueron seleccionadas dos muestras clínicas correspondientes a cada uno de los años estudiados, muestra 01 y 04 (2009), 88 y 113 (2011) y 254 y 259 (2013). Se obtuvieron seis librerías con los 12 amplicones, segmento génico HA y NA para cada muestra clínica.

#### **4.3.1.2 Análisis bioinformáticos: Validación de Reads**

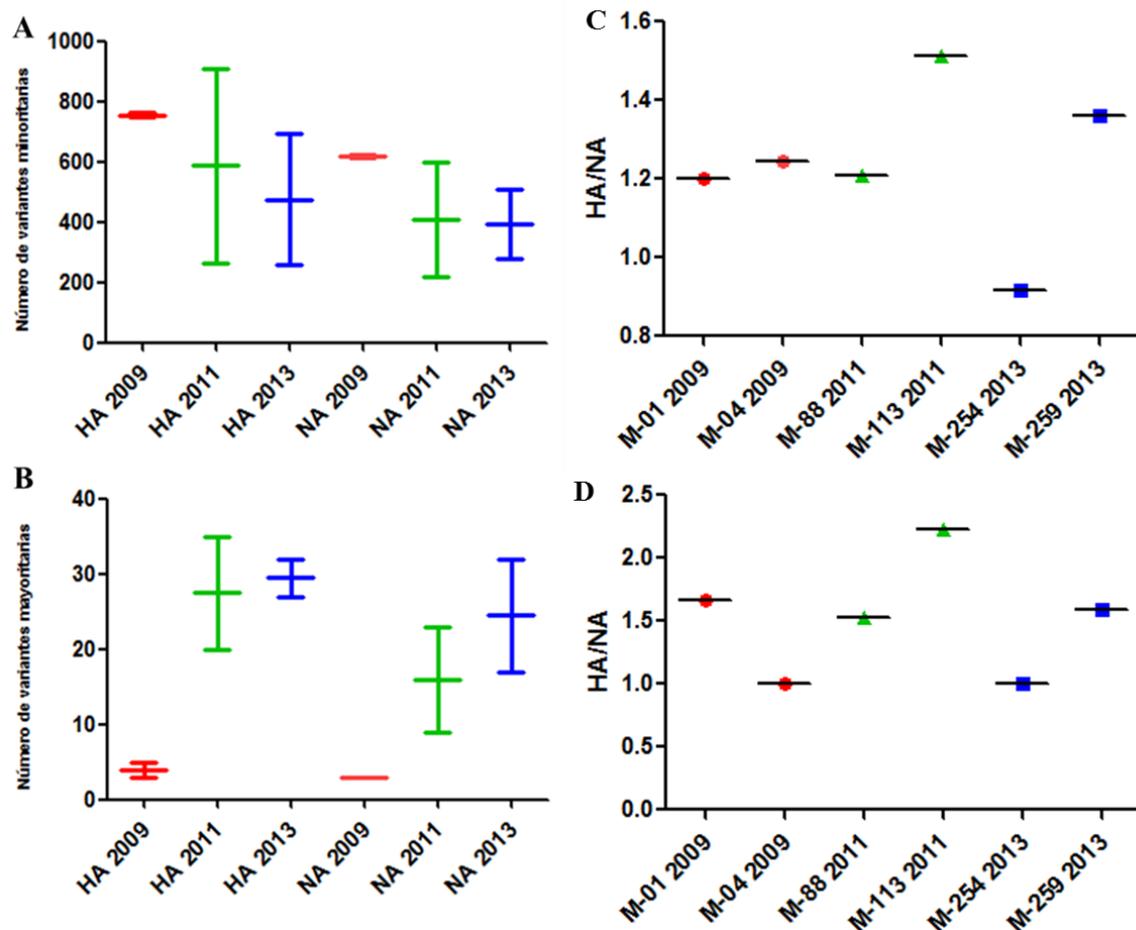
Las secuencias (fastq) de los 12 amplicones superaron el control de calidad inicial de la herramienta fastq-mcf. La cobertura promedio fue de 145590 reads por base secuenciadas, superando en todos los casos el mínimo establecido (100x), ver anexo 2-Capítulo II.

#### **4.3.2 Identificación de variantes minoritarias.**

A partir de los datos obtenidos de secuenciación masiva se pudo identificar variantes mayoritarias y minoritarias para ambos genes. Las variantes fueron determinadas en relación a una cepa de referencia (cepa vacunal). Denominamos variantes minoritarias a aquellas cuya frecuencia fue de entre 0.1 y 0.001, o lo que es equivalente a menores o iguales a 10 % y mayores a 0.1%. Para el segmento génico HA se encontraron entre 265-908 variantes minoritarias y entre 3-35 variantes mayoritarias. En el caso del segmento génico NA, pudimos observar entre 622-219 variantes minoritarias y entre 3-32 variantes mayoritarias. La mayor cantidad de variantes minoritarias para HA correspondió a una muestra perteneciente al año 2011 (muestra A/Uruguay/113/2011), mientras que la muestra con menor número de estas variantes fue una correspondiente al año 2013 (muestra A/Uruguay/254/2013). Con respecto a NA, las muestras aisladas en el año 2009 mostraron la mayor cantidad de variantes minoritarias, mientras que la muestra 88 perteneciente al año 2011 presentó la menor cantidad.

En la figura 22 se muestra en forma gráfica el número de variantes minoritarias y mayoritarias detectadas para cada uno de los genes en cada una de las muestras estudiadas. Si bien las muestras del año 2011 y 2013 no fueron similares en cuanto al número de variantes, se puede observar una tendencia a la reducción en el número de

variantes minoritarias a lo largo de los años. Por otro lado, parecería haber una tendencia a un aumento de en el número de variantes mayoritarias (representadas en más de un 10% en la población) en el periodo de tiempo estudiado, siendo ésta disminución más evidente para el gen NA. Observamos además que el gen HA presentó mayor número de variantes mayoritarias y minoritarias en todas las muestras estudiados, excepto en la muestra 254 del año 2013 en donde se observa un mayor número de variantes minoritarias para el gen NA.



**Figura 22 Representación gráfica del número total de variantes.** Se representa el numero de variantes encontradas para el segmento génico A) variantes minoritarias y B) variantes mayoritarias. Las muestras del año 2009 se indican en (rojo), 2011(verde) y 2013 (azul). Las variantes mayores a 10% están representadas con frecuencias > a 0,1 y las minoritarias con valores de frecuencia que se encuentra entre 0,1 y 0,001.

### **4.3.3 Reconstrucción de secuencias consenso**

Las secuencias consenso de cada segmento génico fueron inferidas a partir de los nucleótidos representados en mayor frecuencia en cada posición. Las secuencias obtenidas por secuenciación de Sanger y secuenciación masiva fueron comparadas para estimar las diferencias nucleotídicas generadas por ambos protocolos. Para el caso del segmento génico NA, la comparación reveló tres sustituciones sinónimas para las muestras del año 2013, G333A en la muestra A/Uruguay/254/2013 y G333A, A627T y A750G en la muestra A/Uruguay/254/2013. Las muestras de los años 2009 y 2011 presentaron un 100% de similaridad nucleotídica comparando ambos métodos.

Con respecto al segmento génico HA, observamos en total trece cambios sinónimos y un cambio no sinónimo. Los cambios sinónimos fueron T1170C, T1191C en la muestra A/Uruguay/01/2009, A373G y T1170C en la muestra A/Uruguay/04/2009, T402C en A/Uruguay/88/2011 y T465C, A966G, A579G, T1041C, T1056C, G1158A, A1386G y A1230G en A/Uruguay/259/2013. Para la muestra A/Uruguay/04/2009 se detectó un cambio no sinónimo al comparar ambas secuencias consenso. Mientras que en la secuencia consenso obtenida por secuenciación de Sanger se había observado el cambio V125M, éste no se encontraba en la secuencia consenso reconstruida mediante la secuenciación masiva. Sin embargo, pudimos observar que dicho cambio estaba representado en un 11.9% de las variantes.

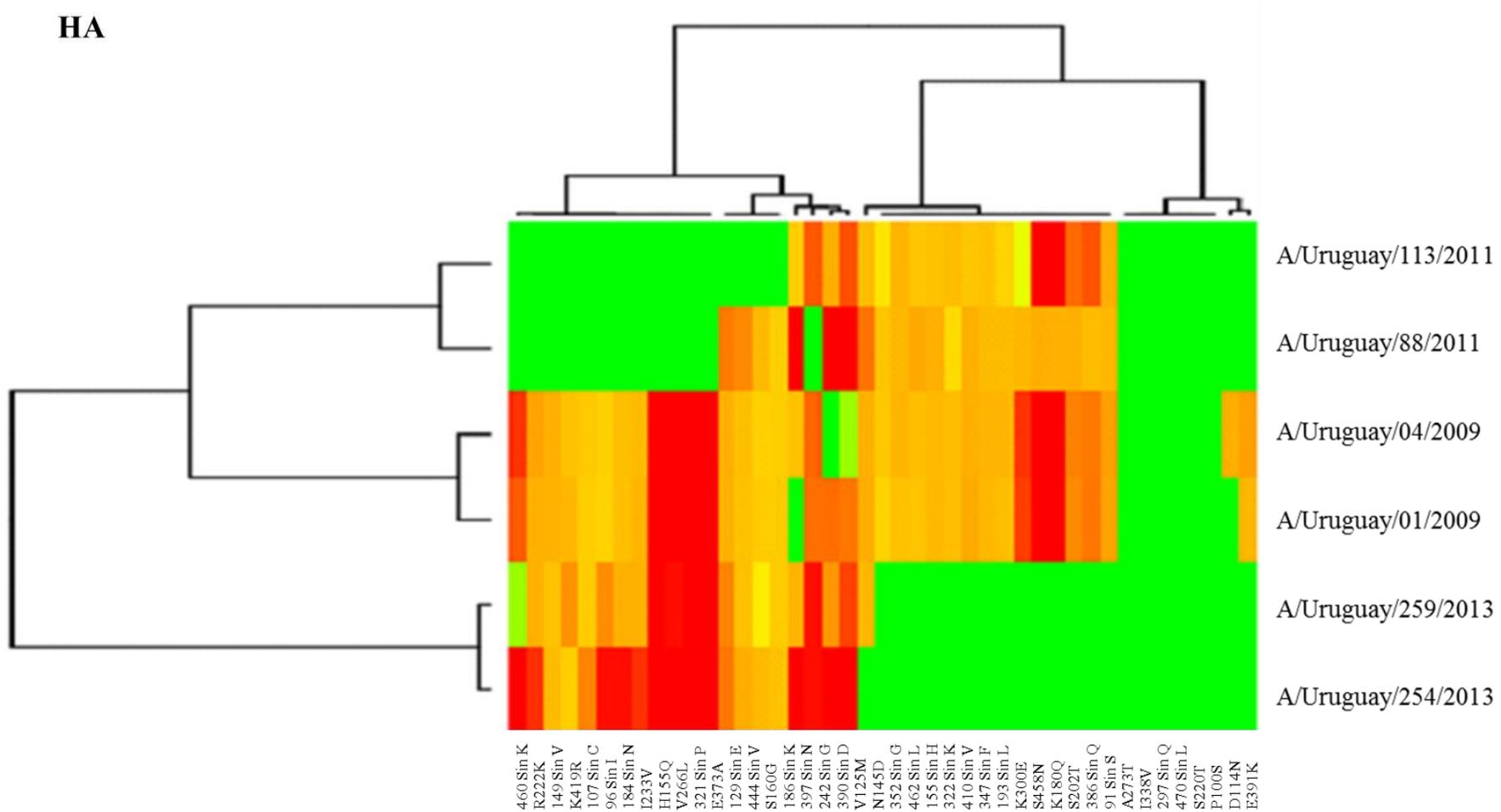
#### **4.3.3.1 Identificación de cambios sinónimos y no sinónimos comparando con la cepa vacunal**

Se evaluaron los cambios sinónimos y no sinónimos en la secuencia consenso que fue reconstruida para el segmento génico HA y NA para cada una de las muestras a partir de la secuenciación masiva con respecto a la cepa vacunal (A/California/07/2009).

Analizando el segmento génico HA, se identificaron siete cambios conservados para todas las muestras estudiadas, de los cuales dos fueron cambios sinónimos y cinco no sinónimos. Para las muestras del año 2009 se identificaron dos cambios sinónimos y un solo cambio no sinónimo. Analizando las posiciones de estos cambios en las muestras pertenecientes al año 2011 y 2013, se pudo observar que dichos cambios pasaron a estar representados en variantes minoritarias o directamente desaparecieron de la población viral. Durante el año 2011 se detectaron diecinueve cambios, once fueron cambios sinónimos y 8 no sinónimos. Once de estas variantes ya circulaban como parte de la población viral de las muestras del año 2009 en una frecuencia menor a 0.1, formando parte de las variantes minoritarias. A su vez, nueve de estas once variantes permanecieron como variantes minoritarias en las muestras del año 2013. Con

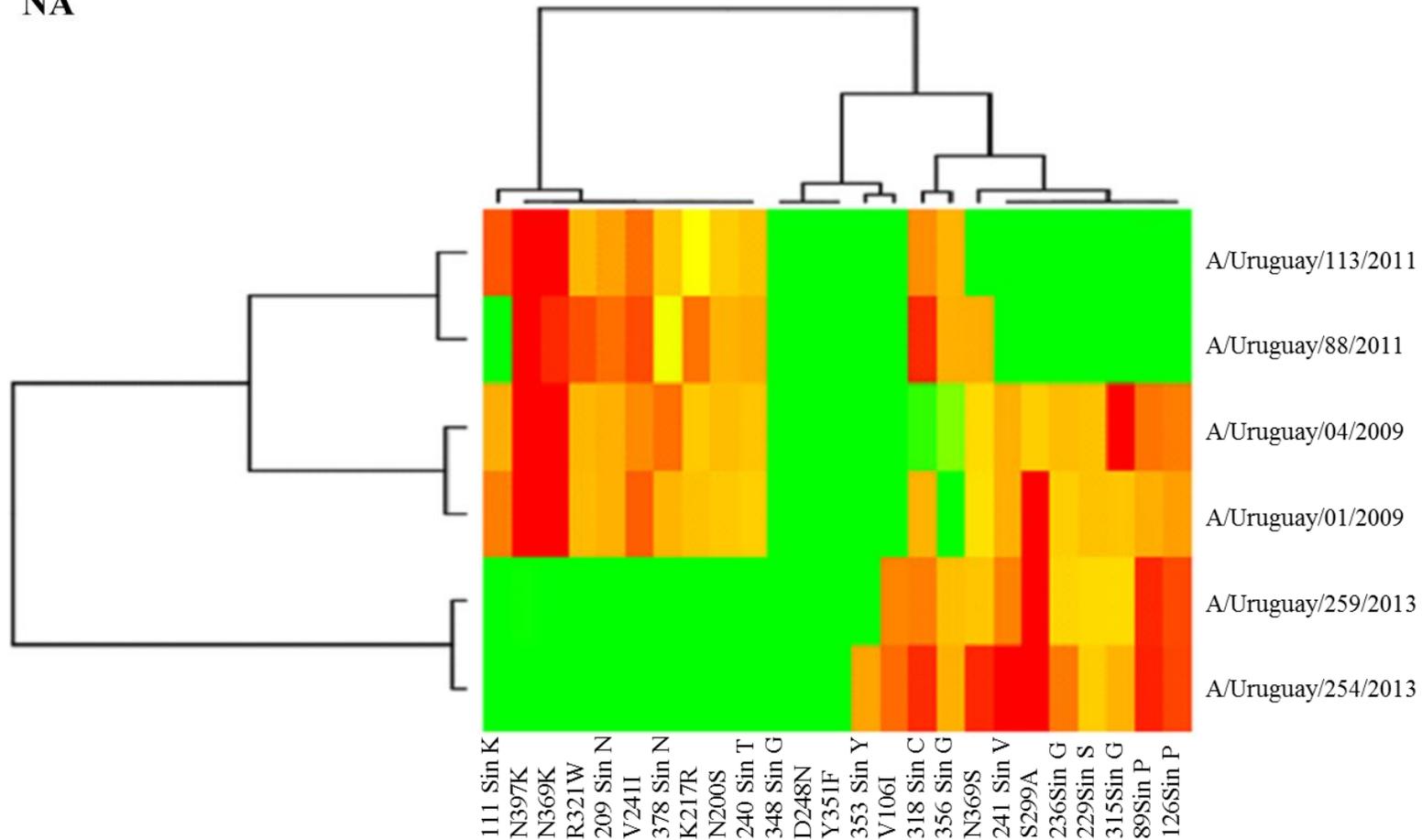
respecto a los cambios detectados para el año 2013, nueve correspondieron a cambios sinónimos y seis fueron cambios no sinónimos. Trece de estas variantes se identificaron como variantes minoritarias en las muestras del año 2011 y ocho fueron identificados también en las muestras del año 2009. Para algunas sustituciones se puede observar que la frecuencia de las variantes va aumentando desde el año 2009 al 2013, cuando estas ya forman parte de la población de variantes mayoritarias, ver figura 24. Los cambios no sinónimos identificados en la secuencia consenso reconstruida fueron los mismos que se detectaron mediante secuenciación de Sanger, ver figura 23.

Por otra parte, analizando el segmento génico NA se pudo identificar cuatro cambios con respecto a la cepa vacunal en todas las muestras analizadas. Dos de estos cambios fueron sinónimos y dos no sinónimos. Las muestras estudiadas pertenecientes al año 2009 mostraron dos cambios sinónimos con respecto a la cepa vacunal. Dichos cambios se observaron en las muestras de los años 2011 y 2013 pero en frecuencias mucho menor, siendo parte de las variantes minoritarias. En las muestras del año 2011 se identificaron seis cambios sinónimos y dos no sinónimos. Seis de éstos cambios ya se encontraban representados en variantes minoritarias en el año 2009 y luego en el año 2013, solamente tres de estos cambios permanecieron en la población. Con respecto a las muestras estudiadas pertenecientes al año 2013 se pudo identificar cuatro cambios sinónimos y seis no sinónimos. En este caso, cinco de estos cambios ya circulaban en las poblaciones virales de los años anteriores, ver figura 24.



**Figura 23. Representación gráfica de los cambios sinónimos y no sinónimos que ocurrieron en la secuencia consenso del gen HA con respecto a la cepa vacunal (A/California/07/2009).** En la figura se muestra en verde los cambios en la secuencia consenso para cada muestra estudiada (variantes mayoritarias), los cambios que no fueron encontrados se muestran en rojo y los demás colores representan cambios que se encuentran en una frecuencia menor al 10% (variantes minoritarias).

NA



**Figura 24. Representación gráfica de los cambios sinónimos y no sinónimos que ocurrieron en la secuencia consenso del gen NA con respecto a la cepa vacunal (A/California/07/2009).** En la figura se muestra en verde los cambios en la secuencia consenso para cada muestra estudiada (variantes mayoritarias), los cambios que no fueron encontrados se muestran en rojo y los demás colores representan cambios que se encuentran en una frecuencia menor al 10% (variantes minoritarias).

#### **4.3.4 Detección de variantes asociadas a resistencia a los antivirales.**

En esta oportunidad utilizamos la tecnología de secuenciación masiva, de modo de realizar un análisis de las poblaciones virales dentro de cada muestra, de manera de detectar variantes asociadas a resistencia que se encuentren representadas en baja frecuencia en la población.

A pesar de la profundidad de la secuenciación, no se lograron identificar variantes minoritarias que portaran la sustitución H275Y en el segmento génico NA, ya que si bien para algunas muestras se observó variantes con esta sustitución, su frecuencia fue menor a 0.001 por lo tanto, estando en menos de 0.1% de la población.

Sin embargo, si logramos identificar para la gran mayoría de las muestras, variantes minoritarias con la sustitución N295S, asociada a resistencia al Oseltamivir [139]. Asimismo, se observaron variantes minoritarias para alguna de las muestras con sustituciones I223/V/T/M, relacionadas a la disminución en la susceptibilidad al Oseltamivir y Zanamivir.

Con respecto a las sustituciones permisivas para la fijación de la sustitución H275Y, si bien los cambios V234M y T298M no fueron detectados y la sustitución R257K se observó en menos de 0.1% de la población, las sustituciones V241I y N369K fueron detectadas en variantes minoritarias y mayoritarias en distintas muestras. Mientras que en el año 2011 dichas sustituciones formaron parte de las variantes minoritarias, para el año 2013 tomaron mayor representación pasando a formar parte de las secuencias consenso, ver tabla 8.

**Tabla 8. Frecuencias de variantes para posiciones relacionadas a resistencia a los INA.**

<b>Mutación</b>	<b>M/01/2009</b>	<b>M/04/2009</b>	<b>M/88/2011</b>	<b>M/113/2011</b>	<b>M/254/2013</b>	<b>M/259/2013</b>
H275Y	0,08%	0,03%	0%	0,03%	0%	0,02%
I223R	0%	0%	0%	0%	0%	0%
I223M	0,07%	0,09%	0%	0,21%	0%	0,06%
I223T	0,09%	0,12%	0%	0,29%	0%	0,04%
I223V	0,10%	0,10%	0,02%	0,08%	0,01%	0,07%
S247N	0,08%	0,02%	0,08%	0,03%	0%	9,40%
N295S	0,18%	0,16%	0%	0,17%	0,08%	0,24%
V241I	0,05%	0,07%	0,14%	0,16%	99,93%	99,77%
N369K	0%	0%	0,12%	0%	99,81%	99,93%
R257K	0,06%	0,08%	0,07%	0,06%	0,07%	0,01%
T289M	0%	0%	0%	0%	0%	0%
V234M	0%	0%	0%	0%	0%	0%

#### **4.4 Discusión Capítulo II**

Como mencionamos anteriormente, la alta tasa de error que experimentan los virus RNA tiene como resultado la generación y co-circulación de variantes genéticas, denominadas cuasiespecies. Las altísimas tasas de mutación y el gran tamaño poblacional de las cuasiespecies virales permiten a los virus RNA evolucionar y adaptarse rápidamente a diferentes cambios durante una infección. Si bien el método de secuenciación de Sanger es muy utilizado para estudios de identificación viral y análisis filogenéticos, el mismo presenta poca resolución para estudios poblacionales ya que se basa en una única lectura de la secuencia y es capaz de detectar variantes para cada posición nucleotídica únicamente si están presentes en elevadas frecuencias (30-40%)[37]. Mediante secuenciación masiva podemos detectar variantes representadas en menor frecuencia, las cuales pueden emerger, aumentando su frecuencia en la población, hasta convertirse en predominantes, bajo diferentes presiones como las ejercidas por el sistema inmune, cambio de hospedador o como resultado de la terapia antiviral. Por lo antedicho resulta de suma importancia estudiar mediante esta metodología de secuenciación, qué variantes circulan en los virus pandémicos y post pandémicos y si éstas presentan diferencias genéticas en sitios antigénicos o relacionados a la resistencia a los antivirales, ya que podrían emerger en un futuro cercano.

Para el análisis mediante secuenciación masiva fueron seleccionadas dos muestras clínicas correspondientes a cada uno de los años estudiados, muestra 01 y 04 (2009), 88 y 113 (2011) y 254 y 259 (2013). Consideramos que se logró con éxito la generación de las librerías y la corrida de secuenciación ya que las secuencias fastq de los 12 amplicones superaron el control de calidad inicial de la herramienta fastq-mcf y la cobertura para cada gen analizado fue muy alta, superando en todos los casos el mínimo establecido 100X, siendo la cobertura promedio de 145590 reads por base secuenciadas.

El análisis de las secuencias utilizando el software ViVan permitió establecer parámetros poblacionales tales como la presencia de variantes minoritarias y mayoritarias, cambios aminoacídicos asociados a las variantes y cambios sinónimos y no sinónimos. El análisis de diversidad poblacional mostró la presencia de variantes minoritarias y mayoritarias en distinta proporción para cada uno de los genes y en cada uno de los años estudiados. En términos generales, se observó un aumento en el número de variantes mayoritarias a lo largo de los años y una disminución en cuanto a las variantes minoritarias. La mayor diversidad poblacional en referencia a las variantes minoritarias observada para las muestras del año 2009, podría explicarse, como un

---

mecanismo de adaptación, teniendo en cuenta que el virus se diseminó en la población humana por primera vez en el año 2009. Observamos que los virus aislados en el año 2011 y 2013 presentaron una disminución de estas variantes y un aumento en el número de variantes mayoritarias, posiblemente, debido a la selección de algunas variantes, como consecuencia de diferentes presiones impuesta por el hospedero, como la respuesta inmune o terapias antivirales. Asimismo, pudimos observar que, excepto para la muestra (A/Uruguay/254/2013), todas las muestras analizadas presentaron mayor número de variantes mayoritarias y minoritarias para el segmento génico HA vs NA.

Al comparar las secuencias consenso obtenidas por secuenciación de Sanger y por secuenciación masiva, se estimaron las diferencias generadas a nivel de nucleótidos mediante la utilización de ambos protocolos. En el caso de NA, las muestras de los años 2009 y 2011 presentaron un 100% de similaridad nucleotídica y una sola muestra del año 2013 presentó tres sustituciones sinónimas. Con respecto a HA la comparación reveló la existencia de trece cambios sinónimos y un cambio no sinónimo. Con respecto al cambio, V125M, fue observado en la secuencia obtenida por secuenciación de Sanger y mediante secuenciación masiva fue detectado pero como una variante mayoritaria en una frecuencia de 0.119. Este cambio no formó parte de la secuencia consenso reconstruida. Estos resultados evidencian la importancia de la profundidad en la secuenciación para obtener una información más detallada de las estirpes circulantes.

Cuando se realizó la comparación, entre las secuencias consenso para HA y NA de cada muestras con la cepa vacunal, se logró observar las mismas sustituciones no sinónimas que habían sido determinadas con la secuenciación de Sanger. Mediante el empleo del análisis a través de los heatmaps, se pudo observar como las variantes que emergieron en el año 2011 y 2013, formaban parte de la población viral en el año 2009. Pudimos determinar que las variantes minoritarias de HA y NA exploran el espacio de secuencia de manera diferencia a lo largo del tiempo y son capaces de emerger y formar parte de las variantes mayoritarias.

Por otro lado, a pesar de las sustituciones asociadas a resistencia no fueron detectadas en las muestras uruguayas analizando la secuencia consenso, obtenida por secuenciación de Sanger, la implementación de las nuevas tecnologías de secuenciación permitió detectar diferentes variantes minoritarias asociadas a la resistencia a los NAIs. Asimismo, a pesar del bajo número de muestras analizadas por esta metodología de secuenciación, logramos observar cómo diferentes variantes asociadas a restaurar el efecto negativo de la mutación H275Y, pasaron de estar poco

representadas en la población viral en el año 2009 y 2011, a encontrarse en altas frecuencias, formando parte de la secuencia consenso en el año 2013. El aumento en la frecuencia de resistencia al Oseltamivir es de preocupar ya que ésta droga es en la actualidad el agente antiviral más utilizado para el control de las infecciones por virus Influenza.

Dado la mayor disponibilidad y reducción en lo que refiere a costos en estas tecnologías de secuenciación, este tipo de estudios sugiere la importancia de la implementación de éstas tecnologías como parte de la vigilancia epidemiológica de estas cepas, de modo de predecir la emergencia de estirpes resistentes o variantes epidémicas o incluso, con potencial pandémico.

**5.Capítulo III: Estudio de cuasiespecies aisladas de infecciones in vivo mediante secuenciación masiva**

## **5.1 Objetivo Capítulo III**

Tomando en cuenta la dinámica poblacional de los virus RNA y el rol que juegan las diferentes variantes minoritarias en la evolución y patogénesis de estos virus, nos planteamos realizar un primer abordaje al estudio de cuasiespecies aisladas de infecciones *in vivo*, para estudiar la dinámica de variantes minoritarias en la compartimentalización durante el transcurso de una infección.

### **Objetivos Específicos**

Generación de stocks virales y evaluación *in vitro* de su estabilidad en el tiempo.

Puesta a punto de una infección oral en modelos murinos y posterior evaluación de su eficiencia.

Analizar variantes minoritarias en la población de cuasiespecies y su posible implicancia en la compartimentalización mediante abordajes de secuenciación masiva.

## **5.2 Materiales y métodos Capítulo III**

Para llevar a cabo los objetivos planteados en este capítulo, se empleará el modelo Coxsackie Virus B3 (CVB3), el cual nos garantizará el uso de modelos murinos y un grado de bioseguridad adecuado para llevar adelante estos experimentos.

### **5.2.1 Obtención de partículas virales**

En primer lugar se realizó la transformación de cepas *Escherichia coli* (E.coli) XL1-blue utilizando el método de shock térmico, con dos clones infecciosos diferentes (CVB3-Nancy y CVB3- H3). Dichos clones contenían la secuencia codificante para el genoma de dos cepas del virus Coxsackie B3, Nancy y H3. Luego de la transformación, se llevó a cabo la purificación del DNA plasmídico utilizando un kit de purificación a partir de PCR (Qiagen).

Para llevar a cabo la transcripción *in vitro* del genoma, fue necesario en primer lugar la linealización del plásmido mediante la enzima de restricción Sal I, ya que el genoma presentaba un único sitio de corte para esta enzima, justo antes del promotor T7. Para dicha reacción se utilizaron 5µg de DNA plasmídico y 50U de enzima. Esta mezcla se incubó por 2 hs a 37°C en buffer de reacción. La transcripción *in vitro* se llevó a cabo en un volumen final de 100µl conteniendo, 20µl de solución tampon T7 5X, 5µL de DTT (100mM), 2µl de NTPs (25mM), 2.5µL de RNAsa-out, 2µl de T7 RNA polimerasa (Fermentas), 50µl de DNA linealizado y purificado y 18.5µl H<sub>2</sub>O. Finalmente, la mezcla se incubó 3hrs a 37°C. El RNA obtenido fue purificado con Fenol-Cloroformo, cuantificado y almacenado a -80°C.

Paralelamente *in vitro*, se trabajó con dos líneas celulares, Vero y HeLa, las cuales fueron crecidas y mantenidas en un medio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Gibco) suplementado con suero fetal bovino (SFB) (Gibco) al 10% y 1% de estreptomicina/penicilina (S/P) (Sigma), a 37°C en estufa de CO<sub>2</sub> al 5%. Estos ensayos se llevaron a cabo en una sala con nivel de seguridad 2.

Con el objetivo de generar partículas virales *in vitro* se realizó la transfección de células HeLa. Para ello, se utilizaron células en una concentración de 10 millones de células/ml en PBS y se agregó 1-2µg de RNA invitrotranscripto por 10<sup>6</sup> células en un volumen de 400µl de células. Posteriormente, las células fueron electroporadas a 700V, 25mF y máxima resistencia, utilizando el aparato GenePulserXCell (BioRad). Luego de la electroporación, éstas células se incubaron en 10ml de medio a temperatura ambiente y finalmente se pasaron a una botella de cultivo T25, las cuales fueron incubadas a 37°C

en estufa de CO<sub>2</sub> al 5%. A las 24hrs post infección (p.i) se visualizó al microscopio óptico efecto citopático total. Mediante sucesivas etapas de congelamiento y descongelamiento fue posible realizar la ruptura de las células y por lo tanto la liberación de los viriones, (progenie cero = Po). Se centrifugó todo a 3500rpm por 5min, de forma de pelear las células y detritos celulares, y los virus en el sobrenadante fueron alicuotados en criotubos y almacenados a -80°C (stocks virales).

#### **5.2.1.1 Infección en células HeLa**

A partir de la progenia inicial, denominada Po, se realizó la infección en células HeLa con un Multiplicidad de infección (MOI) =1. Se visualizó el efecto citopático total aproximadamente 48 horas p.i y posteriormente se procedió a la obtención de los viriones de la (progenie uno=P1) al igual que en la etapa anterior.

#### **5.2.1.2 Titulación del virus**

Las partículas virales se titularon mediante los métodos de titulación por dosis infectante 50% (TCID<sub>50</sub>) y por plaqueo viral. Para estos ensayos se utilizó la línea celular Vero.

Para realizar la titulación por dosis infectante 50% (TCID<sub>50</sub>), se partió de 150µl de cada virus (progenie uno P1) y se realizaron diluciones seriadas 1/10 (-1 a -8) con medio DMEM libre de SFB. Las diluciones se utilizaron para infectar monocapas confluentes de células en placas de 96 pocillos (10.000 células por pocillo). Las placas se incubaron en estufa de CO<sub>2</sub> al 5% a 37°C y se revelaron una semana después de la infección mediante el uso de formalina y solución de cristal violeta al 0.025%. El título en todos los casos se determinó como el número de partículas virales por mililitro (ml).

En el caso de la titulación por plaqueo viral, se sembraron placas de 6 pocillos cada una con una densidad de  $2 \times 10^6$  células/pocillo. Se realizaron diluciones de -1 a -8 a partir de 30µl de los stock virales y se diluyeron en 270µl de medio DMEM libre.

Cada pocillo conteniendo la monocapa de células se infectó con 250µl de cada una de las diluciones y fueron incubadas a 37°C por 1hr agitando las placas cada 10 minutos. Luego de 1hr de infección, se añadió a cada uno de los pocillos de la placa, 3ml de una mezcla conteniendo (20ml de agarosa al 4% en agua con 400ml de medio DMEM completo calentado previamente 42°C) Se dejó reposar 15-20min a temperatura ambiente y luego se incubó a 37°C en estufa de CO<sub>2</sub>. A las 48 horas p.i las placas fueron reveladas con formalina 4% y cristal violeta. De esta forma se pudo calcular el título viral contando las unidades formadoras de placa (PFU) para cada stock viral.

### 5.2.2 Infección *in vivo*

Para los estudios *in vivo* se utilizaron dos modelos murinos, por un lado ratones balb/c y ratones CH3, hembras de 5 semanas. Ambos tipos de ratones fueron infectados con un título viral de  $1.0 \cdot 10^4$  TCID<sub>50</sub>/ml en 250µL de forma intraperitoneal (IP) o por infección oral-Gavage (G), con las dos cepas de virus Coxsakie B3 (CVB3- Nancy y CVB3-H3).

A los 3, 5 y 7 días p.i, los ratones fueron eutanasiados mediante el método de dislocación cervical, (tarea realizada por el Dr. Gonzalo Moratorio) y en cada caso se tomaron muestras de pancreas, corazón y bazo, siempre manteniendo las muestras en hielo. Se utilizaron tres ratones por punto de tiempo y por grupo como se muestra en la figura 26. Estos estudios se realizaron en un laboratorio de bioseguridad nivel 3 perteneciente al Instituto Pasteur Paris.



X Se toman muestras de pancreas, corazón y bazo

**Figura 25. Diagrama de trabajo *in vivo*.** A ambos modelos murinos (balb/c y CH3), se les administró via IP u oral una dosis de virus de  $1.10^4$  TCID<sub>50</sub>/ml. A los 3, 5 y 7 días p.i, se tomaron muestras de pancreas, corazón y bazo para su posterior análisis.

Durante el Procesamiento de muestras, cada uno de los órgano se homogeneizó en 1.3ml PBS en tubos con cuentas de porcelana (ceramic beads) y se centrifugó por 20 segundos a 5000rpm (2 veces), y luego a 10000rpm por 10min a 4°C, de forma de disgregar todo el tejido. Se tomaron 500µl de sobrenadante para la extracción de RNA por Trizol y para la titulación viral se tomaron 500µl adicionales diluido en 500µl PBS.

### **5.2.3 Evaluación de la eficiencia de infección**

La eficiencia de infección fue medida a través de la evaluación del RNA genómico viral mediante RT-PCR cuantitativas (qRT-PCR), mientras que la producción de partículas virales fue evaluada por titulación por dilución límite.

Con el objetivo de evaluar la eficiencia de infección por qRT-PCR (cantidad de RNA genómico producido) por vía intraperitoneal y por vía oral a los 3, 5 y 7 días p.i se realizó la extracción de RNA y posterior qRT-PCR.

La extracción de RNA se realizó mediante el método de Trizol-Cloroformo. A los tubos que contenían 500µl de trizol y 500µl de muestra en PBS, se le agregó 200µl de cloroformo, se mezcló y se centrifugó por 10min a 12000 rpm. Luego se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo y se le adicionó 1µl de Glycoblue, el cuál permite mejorar la visualización del pelet de RNA.

Se precipitó el RNA por el agregado de 500µl de isopropanol se mezcló por inversión varias veces, y se dejó incubar a temperatura ambiente por 10min. Luego se centrifugó por 20min a 12000 rpm y al finalizar, cuidadosamente se aspiró el sobrenadante y se pudo apreciar un pelet de color azul correspondiente al RNA. Dicho pelet fue lavado con etanol 75% y luego fue resuspendido en 40µl de H<sub>2</sub>O libre de RNAsas.

Para las qRT-PCR se utilizó el kit TaqMan RNA-to-CT 1-Step Kit (Applied Biosystems). La amplificación se realizó en un termociclador ABI 7000.

A partir de una muestra de RNA de concentración conocida se realizó una curva estandar ( $y = -0,2837x + 12,611$ ,  $R^2 = 0,99912$ ) con distintas diluciones cuya concentraciones fue desde  $10^{-1}$  a  $10^{-8}$ . La mezcla de reacción se realizó en un volumen final de 25µl: se mezcló 5µl de una solución tampón 2X, 0,23µl de cada uno de los primers (CVB3 For 5'GCATATGGTGATGATGTGTCGCTAGC3' y CVB3 Rev 5'GGGGTACTGTTCATCTGCTCTAAA3') 100µM, 1,9µl de la sonda MGB-FAM 5'-[6-Fam]GGTTACGGGCTGATCATG-3' (2µM), 0,5µl de la enzima TaqMan RT, 5µl de RNA y H<sub>2</sub>O hasta completar el volumen de reacción. Dicha mezcla se incubó a 50°C por 30min luego un paso de activación a 95°C por 10min, seguido de 40 ciclos de tres pasos (desnaturalización a 95°C por 15 segundos, hibridación a 60°C y extensión de 60°C por 1min). Cada una de las muestras se midió por duplicado y se realizó un control negativo utilizando H<sub>2</sub>O en vez de RNA.

#### **5.2.4 Estudio de la diversidad poblacional por secuenciación masiva**

Con el objetivo de estudiar la variabilidad existente en las poblaciones de cuasiespecies en distintos órganos a partir de una infección in vivo se realizó la retrotranscripción previo a la amplificación de los genomas virales.

La retrotranscripción se realizó a partir de 250ng a 1mg de RNA, utilizando la enzima Maxima H Minus Reverse Transcriptase (Thermo Scientific). La reacción comenzó con una primera mix conteniendo el RNA, 1µl dNTPs 10mM, 1µl de oligo dT, y H<sub>2</sub>O hasta completar 15µl. Esta mezcla se incubó por 5min a 65°C y luego 1min en hielo, y finalmente fue añadida a una segunda mix conteniendo 4µl de solución tampón 5X y 1µl de enzima. Las condiciones para el termociclador fueron: 50°C 30min, 85°C 5min y finalmente 20°C 15min.

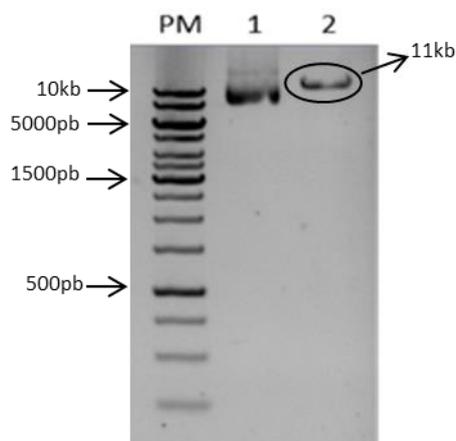
A continuación se realizó una amplificación por PCR de todo el genoma viral de aproximadamente 7,4 Kb para cada una de las muestras mediante la enzima Phusion DNA Polymerase High-Fidelity (Thermo Scientific). Para la amplificación por PCR se agregaron 4µl de cDNA a una mezcla con un volumen final de 50µl, conteniendo 10µl de una solución tampón 5X, 1µl de cada cebador 10mM (120F 5' GAAAACGCGGGGAGGGTCAA3' y 7297R 5'ACCCCTCCCCCAACTGTAA3'), 1µl de dNTPs 10mM, 1µl de enzima, y 32µl de H<sub>2</sub>O MiliQ. La totalidad de la mezcla se calentó a 98 °C 30 segundos y luego 35 ciclos con una temperatura de desnaturalización de 98 °C 10 segundos, hibridación a 55°C 30 segundos y de extensión a 72 °C por 1.30 min. Finalmente se mantuvo a 72°C por 10 min y se dejó a 25°C por unos minutos.

Con el objetivo de estudiar variantes virales en cada uno de los órganos se realizaron las librerías y posterior corrida de secuenciación, utilizando los mismos protocolos ya descritos anteriormente para la secuenciación masiva de las cepas del virus de Influenza. Una vez más, luego de obtener los datos de secuenciación masiva, éstos fueron analizados mediante el programa ViVian [41].

## 5.3 Resultados Capítulo III

### 5.3.1 Producción de stock virales

La transformación de las cepas *E.coli* XL1-blue con los clones infecciosos CVB3-Nancy y CVB3-H3, se realizó con éxito. Posteriormente se realizó la purificación y linealización de los plásmidos como se muestra en la figura 26. Los plásmidos linealizados fueron utilizados como molde para la transcripción *in vitro* y posterior obtención de RNA viral infeccioso.

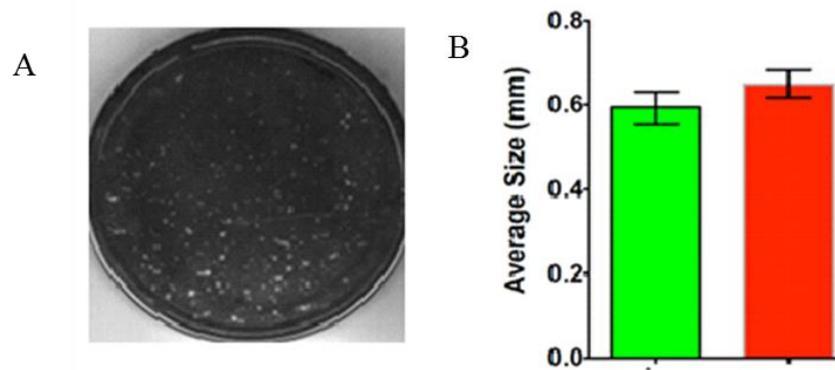


**Figura 26. Electroforesis de agarosa al 1% para visualizar los plásmidos linealizados.** En el carril 0 se corrió un peso molecular de 1Kb, en el carril 1 el plásmido sin digerir y en el carril 2 el plásmido linealizado.

Una vez obtenido el RNA viral se realizó la transfección de células HeLa para obtener la progenie cero (Po). A partir de esta Po se infectaron células HeLa con un MOI=1 para obtener el primer pasaje correspondiente a la progenie 1 (P1). Esta progenie viral fue titulada por el método de dilución límite y por ensayo de placa infectando células Vero.

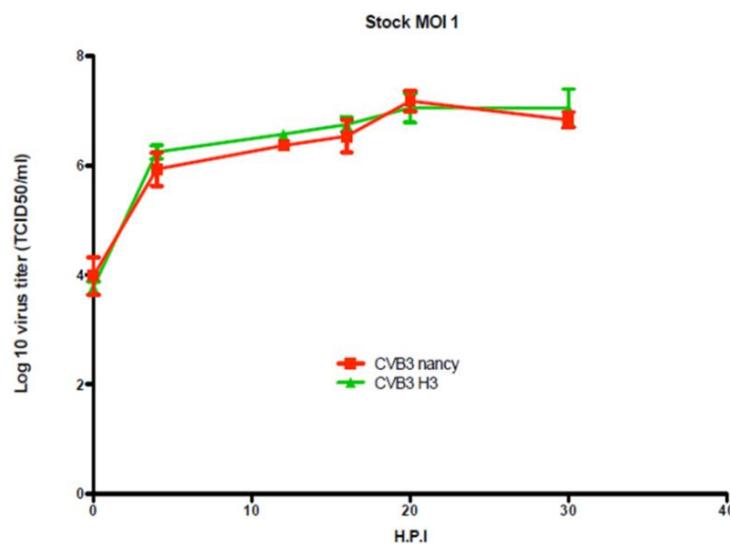
Los resultados obtenidos mediante la titulación por dilución límite o dosis infectante 50% fue  $5.2 \times 10^7$  TCID<sub>50</sub>/ml para la cepa nancy, mientras que para la cepa viral H3 se obtuvo un título de  $6.8 \times 10^7$  TCID<sub>50</sub>/ml. Dichos valores fueron obtenidos luego de 48 horas post infección (HPI) y previa observación de completa lisis celular.

Mediante el ensayo en placa obtuvimos los siguientes títulos:  $3.1 \times 10^7$  PFU/ml para la cepa nancy y  $4.6 \times 10^7$  PFU/ml para la cepa H3. Asimismo, no pudimos apreciar diferencias significativas en el tamaño de las placas de lisis generadas por ambas cepas virales, ver figura 27.



**Figura 27. Ensayo de titulación en placa.** A. Visualización de las placas de lisis generadas por una de las cepas en estudio (CVB3 Nancy) sobre una monocapa de células Vero. B. Representación gráfica del promedio del tamaño de las placas de lisis generadas por la cepa Nancy (verde) y la cepa H3 (rojo).

Posteriormente, se realizó una curva de crecimiento para evaluar la estabilidad y viabilidad a lo largo del tiempo de cada una de las cepas virales generadas *in vitro*. Se cuantificó el título viral mediante dilución límite o dosis infectante 50% a partir de cada sobrenadante de cultivo previamente infectados con la cepas Nancy o H3 a diferentes HPI, como se puede ver en la figura 28.

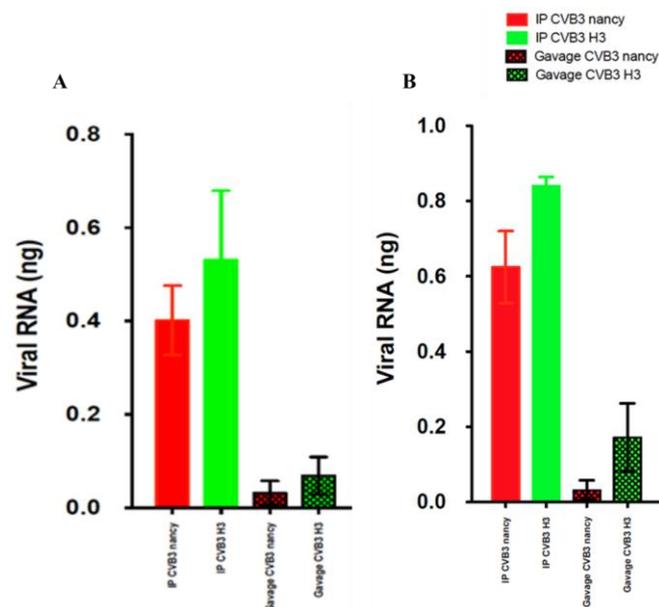


**Figura 29. Curva de crecimiento para cada una de las cepas virales.** Se representa graficamente el logaritmo en base 10 del título viral vs horas post infección en la línea celular Vero infectadas con una MOI=1. En rojo se muestra la curva para CVB3 nancy y en verde para CVB3 H3.

### 5.3.2 Infección *in vivo* y evaluación de la eficiencia de infección

Una vez titulado los virus, se realizaron los ensayos *in vivo*. Para ello, se utilizaron dos modelos murinos balb/c y CH3, hembras de 5 semanas de edad. La infección fue realizada con un título viral de  $1.0 \times 10^4$  TCID<sub>50</sub>/ml por triplicado, por vía intraperitoneal (IP) y por vía oral (G). Al día 3, 5 y 7 p.i se tomaron muestras de distintos órganos (páncreas, corazón y bazo) y fueron procesadas como se detalló en la sección de materiales y métodos.

Con el objetivo de analizar la eficiencia de infección, se realizaron las qRT-PCR, de forma de evaluar los niveles de RNA generado en los distintos órganos a través de la infección vía IP o vía G. A continuación se muestran los valores obtenidos en el órgano bazo. Los resultados de las qRT-PCR se muestran en la Figura 29.

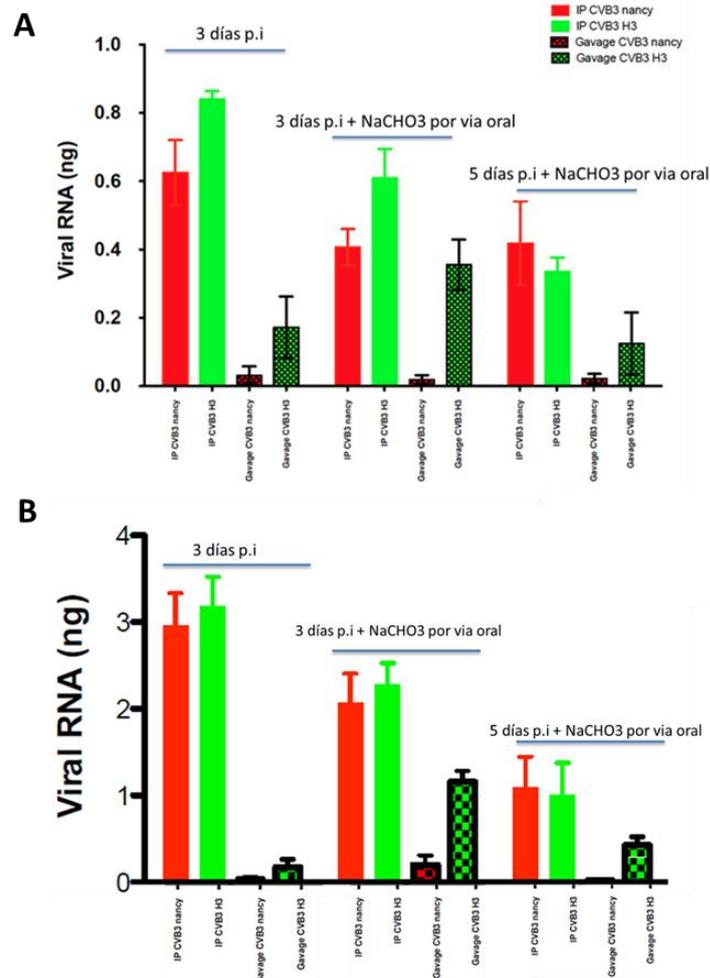


**Figura 29. Cuantificación absoluta por RT-PCR a tiempo real de los niveles de RNA viral.** Se muestra de forma representativa los valores de ng de RNA obtenido en el bazo de ratones infectados con un título viral de  $1.0 \times 10^4$  TCID<sub>50</sub>/ml. En A, se evalúan los niveles de RNA en ratones CH3 y en B en ratones balb/c.

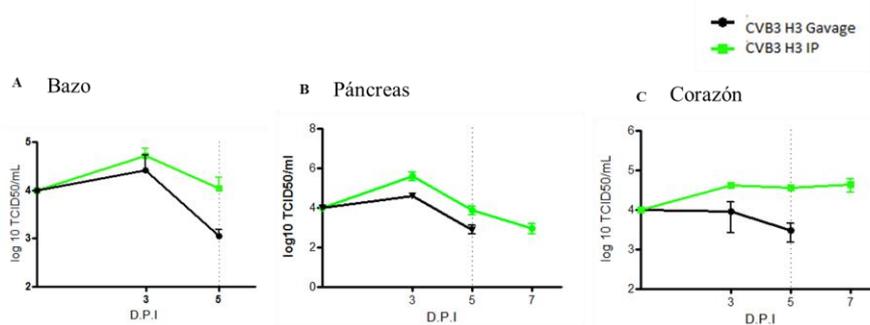
Si bien los títulos virales para ambas cepas por la vía de infección intraperitoneal fue un valor dentro de un rango esperado, la implementación de la metodología de infección oral (G) no fue tan exitosa. Por otro lado, evaluando los dos modelos murinos, se obtuvieron mayores títulos en los ratones balb/c y por lo tanto, los demás ensayos fueron realizados en este modelo murino.

Con el objetivo de mejorar la puesta a punto de infección oral, realizamos el mismo ensayo pero adicionando al inoculo viral bicarbonato de sodio (NaHCO<sub>3</sub>) al 5%, de forma de mejorar las condiciones de pH a nivel intestinal y esperando obtener mayores títulos por una mejor absorción del virus a ese nivel. Los resultados de las qRT-PCR para bazo y el órgano blanco de

infección, pancreas se muestran en la figura 30. En la figura 31 se muestran los títulos virales obtenidos mediante el método de dilución límite para los tres órganos evaluados.



**Figura 30. Cuantificación absoluta por RT-PCR a tiempo real de los niveles de RNA viral.** Se muestran los niveles de RNA en en bazo (A) y pancreas (B), tomados de ratones balb/c, los cuales fueron infectados con un título viral de  $1.0 \times 10^4$  TCID<sub>50</sub>/ml. Cada reacción se realizó por duplicado. La barra vertical corresponde al valor obtenido para la infección con la cepa Nancy y la H3 por via IP y por via oral (G) a los 3 días p.i, a los 3 y 5 días p.i agregando NaHCO<sub>3</sub> por via oral.

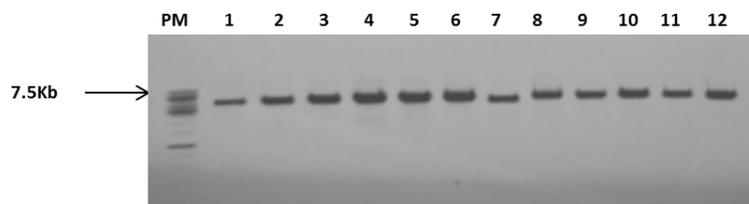


**Figura 31. Titulación de partículas virales por el método de dilución límite a partir de muestras *in vivo*.** Se muestra el logaritmo en base 10 de partículas virales en bazo A, pancreas B y corazón C, a los 3, 5 y 7 días p.i.

### **5.3.3 Estudio de la diversidad poblacional por secuenciación masiva**

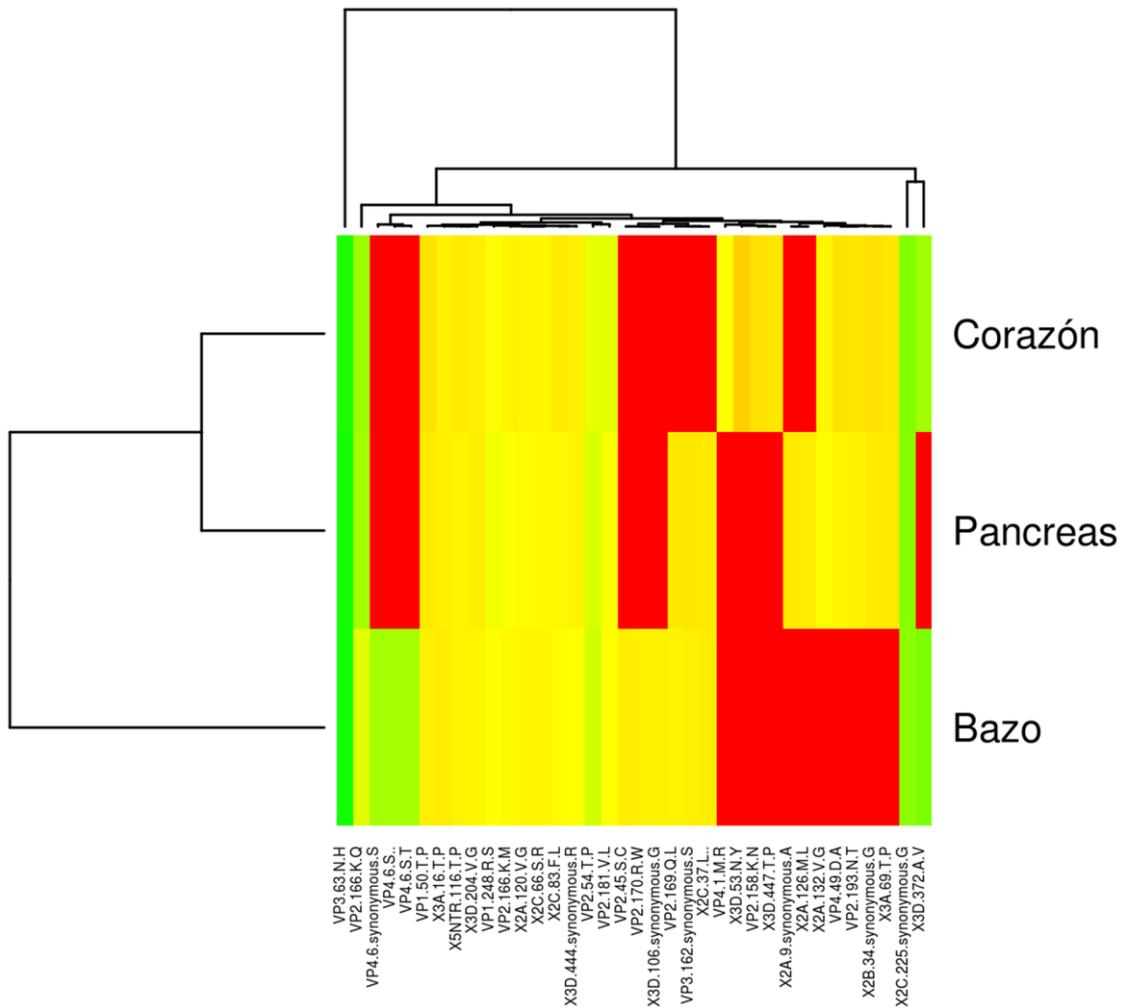
Con el objetivo de estudiar la variabilidad en las poblaciones virales de los distintos órganos a partir de una infección *in vivo* utilizamos la tecnología de secuenciación de próxima generación (NGS) de forma de caracterizar la población total del virus e identificar variantes minoritarias específicas en cada uno de órgano y que podrían cumplir un rol en la patogénesis viral.

Para ello, se procedió a retrotranscripción del RNA a cDNA y luego a la amplificación por PCR utilizando un juego de cebadores y condiciones de amplificación puestas a punto anteriormente en el laboratorio y detalladas en la sección de materiales y métodos. Luego de la amplificación del genoma viral, el mismo se visualizó en un gel de agarosa, ver figura 32.

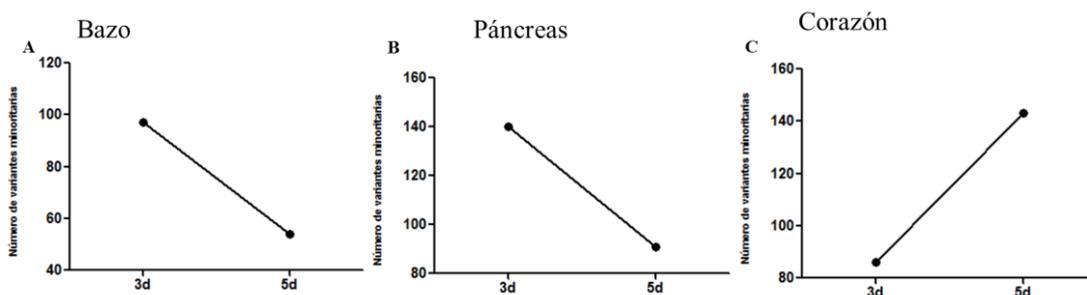


**Figura 32. Gel de agarosa al 1% para visualizar genomas virales.** Se puede apreciar en el primer carril la migración del peso molecular 1Kb (xxx), los carriles 1, 2 y 3 corresponden a genomas provenientes de páncreas, corazón y bazo luego de 3 días pi (IP), los carriles 4, 5 y 6 corresponden a genomas provenientes de páncreas, corazón y bazo luego de 5 días pi (IP). Por otro lado, los carriles 7, 8 y 9 corresponden a genomas provenientes de páncreas, corazón y bazo luego de 3 días pi (G NaHCO<sub>3</sub>) y los carriles 10, 11 y 12 corresponden a genomas provenientes de páncreas, corazón y bazo luego de 5 días pi (G NaHCO<sub>3</sub>).

El análisis de diversidad poblacional mostró la presencia de variantes genéticas específicas para cada uno de los órganos estudiados, indicando la presencia de subpoblaciones del virus en los distintos compartimentos, ver figura 34. Asimismo, se puede observar en la figura 32, una disminución de variantes minoritarias entre el día 3 y 5 en los virus aislados de páncreas y bazo, mientras que los virus aislados de corazón mostraron, en cambio, un aumento de estas variantes.



**Figura 32. Representación gráfica de variantes detectadas en los diferentes órganos a los 3 y 5 días p.i.** En la figura se muestran las variantes de los diferentes organos que fueron encontradas en una frecuencia mayores a 1%. En verde se muestran las variantes cuya frecuencia se encontró entre 1 y 0.05. en amarillo las que presentaron frecuencias de entre 0.049 a 0.01. En rojo se muestran las variantes que no se encontraron en la población.



**Figura 33. Representación gráfica del número de variantes virales detectadas en los diferentes órganos.** Se representan las variantes cuya frecuencia se encontraron entre el 0.01 y 0.001 en la población viral. En A, páncreas, en B, Bazo y en C, Corazón.

## **5.4 Discusión Capitulo III**

Dados los enfoques abordados en los dos primeros capítulos de esta tesis, los cuales contemplan el estudio de la evolución viral desde la filogenética y la epidemiología molecular, decidí realizar una pasantía en el Departamento de Virología del Instituto Pasteur de modo de poder enriquecer mi formación en este campo, desde una perspectiva diferente. En esta ocasión me enfrenté a modelos *in vitro* e *in vivo* de infección con el objetivo de entrenarme en la generación de diferentes estirpes virales, a través de la manipulación de sus clones infecciosos, así como del estudio de la evolución viral en un modelo *in vivo*.

Como ha sido reportado, los fenómenos de competencia y complementación que existen en un espectro de variantes virales, contribuyen de forma directa a las características de la población. Además, es ampliamente conocido que la diversidad genética así como la estructura poblacional de las cuasiespecies desempeñan un papel fundamental en la capacidad de replicación de un virus en un ambiente dado [32]. Asimismo, comprender los mecanismos moleculares que subyacen en la dinámica, interacción y evolución de las cuasiespecies virales es de fundamental importancia para el diseño de nuevas y efectivas estrategias antivirales.

Por lo antedicho, nos planteamos como objetivo de este tercer capítulo estudiar la dinámica poblacional de cuasiespecies provenientes de una infección *in vivo* en un modelo murino. Para realizar esta parte del trabajo fue necesaria la implementación de otro modelo viral con menores requerimientos en cuanto a la bioseguridad necesaria en relación a VIA. Para ello, nos focalizamos en el Virus Coxsackie B3 (CVB3) el cual, no solo nos garantizó el uso de modelos murinos sino que también una mayor disposición de herramientas moleculares para abordar el objetivo trazado. CVB3 pertenece a la familia Picornaviridae y al género enterovirus, son virus desnudos con genomas RNA simple hebra de polaridad positiva de aproximadamente 7,5 Kb de longitud [144]. En particular, los virus Coxsackie del grupo B serotipos (1 a 6) se asocian a una gran variedad de patologías agudas y crónicas en humano incluyendo miocarditis, meningitis, y pancreatitis [145].

Mediante el empleo de un sistema de genética reversa logramos obtener de forma exitosa los stocks virales correspondientes a las cepas Nancy y H3 de CVB3. Los virus fueron colectados a partir de infecciones en cultivos celulares llevadas a cabo en células HeLa. Dichos stocks fueron evaluados mediante curvas de crecimiento para corroborar su viabilidad y estabilidad. La titulación de los mismos fue realizada utilizando dos métodos diferentes, ensayo en placa y el método de dilución límite, y ambos confirmaron, para las 2 cepas virales títulos del orden de  $10^7$  partículas.

De la misma manera, se procedió a trabajar con dos cepas de ratones de modo de investigar diferentes susceptibilidades a la infección por CVB3.

Ensayamos la infección *in vivo* utilizando dos estrategias de inoculación, la vía intraperitoneal y la que simula a la infección natural ocasionada por enterovirus, la vía oral (gavage). La infección intraperitoneal utilizando la cepa Nancy y H3 fue exitosa tanto en ratones CH3 como balb/c. Sin embargo, la infección oral por gavage solo se logró utilizando los ratones balb/c y la cepa H3, e igualmente los títulos obtenidos fueron bajos en relación a la otra ruta estudiada. Con relación al gavage, el mismo fue mejorado significativamente una vez adicionado al inóculo viral NaHCO<sub>3</sub> al 5%. De esta manera pudimos neutralizar, en parte, el pH ácido encontrado en el tracto digestivo, permitiendo una mejor infección a través de mucosas. Si bien el método de infección por vía oral no estaba puesto a punto en el laboratorio, logramos optimizar dicha metodología añadiendo NaHCO<sub>3</sub> al 5%. Mediante esta metodología logramos un incremento en la cantidad de genomas virales así como de partículas infectivas, obteniendo un aumento en la eficiencia de la infección.

Nuestros datos indicaron que los ratones Balb/c fueron más susceptibles ya que obtuvimos cantidades de RNA viral mayores en este modelo murino. Por otra parte se titularon los virus obtenidos de cada muestra mediante el método de dilución límite para determinar la cantidad de partículas virales viables. Muchas veces ambas mediciones no concordaron de forma exacta, siendo lo esperado debido a la gran cantidad de partículas virales no infectivas de las cuales se pudo cuantificar sus genomas por qRT-PCR.

En cuanto al análisis de variantes virales y su posible compartimentalización, se realizó con éxito la amplificación de los genomas virales de forma completa a partir del RNA extraído de cada órgano. Los mayores títulos fueron encontrados en el páncreas luego de 3 días post infección. Estos resultados fueron concordantes con la literatura ya que el páncreas es el órgano blanco de infección para CVB3 [146]. Debido a limitaciones de tiempo durante la pasantía nos propusimos realizar las librerías con aquellas muestras que mayor título viral presentaron. Por lo tanto, se construyeron las mismas a partir del RNA extraído de ratones infectados por vía intraperitoneal con la cepa H3 y posteriormente se efectuó la secuenciación masiva.

El análisis de diversidad poblacional, el cual fue realizado mediante el empleo del software ViVan, mostró la presencia de variantes en distinta proporción en los diferentes órganos estudiados. Pudimos determinar la existencia de variantes genéticas específicas para cada uno de los órganos estudiados indicando la presencia de subpoblaciones del virus en los distintos compartimentos. Esta observación es concordante con la dinámica de cuasiespecies virales reportada. Mayores estudios son

necesarios para investigar si estas variantes presentan ventajas a nivel fenotípico en relación al compartimento del cual fueron secuenciadas.

Asimismo, las variantes representadas entre un 0.1 a 1% mostraron una disminución entre el día 3 y 5 en los virus aislados de páncreas y bazo, mientras que los virus aislados del corazón mostraron un aumento de las mismas. Este fenómeno podría estar asociado a que el corazón es el único órgano en donde CVB3 puede infectar de forma persistente [145]. El aumento de variantes minoritarias indica una menor presión selectiva en dicho compartimento. Desafortunadamente, no se conocen hasta la fecha los mecanismos moleculares por los cuales CVB3 infecta persistentemente al miocardio. Posiblemente la presión inmune podría estar seleccionando virus atenuados o incluso defectivos permitiendo escapar de la limpieza de la infección y de esta forma permitiendo generar una infección persistente [147].

## 6. Conclusiones

Con respecto a la dinámica filogenética de los virus Influenza A H1N1pdm, se logró identificar que los virus aislados en el año 2009 pertenecían al clado 7 (Gr 7-pdm), y que éste clado fue el más representado en la región sudamericana durante esa temporada. Asimismo, las muestras aisladas en el periodo post pandémico pertenecieron a tres de los siete nuevos grupos reportados, (Gr 5, Gr 6 y Gr 7), observándose la co-circulación de linajes en el año 2013 en Uruguay (Gr 6 y Gr 7).

Los análisis filogenéticos revelaron que todas las cepas del año 2009 estaban más genéticamente relacionadas entre sí y mantenían cierta distancia genética con aquellas cepas aisladas en los años subsiguientes. Además la cepa vacunal A/California/7/2009 fue genéticamente distante a todas las cepas de las tres temporadas estudiadas.

La comparación de las secuencias de aminoácidos de las cepas uruguayas con la cepa vacunal reveló una gran variabilidad tanto para el segmento génico HA como para NA.

En el caso de HA:

Para la gran mayoría de las muestras analizadas no detectamos cambios en los aminoácidos que forman parte del sitio de unión al receptor, ni en las tres estructuras secundarias conservadas que delimitan esta región.

Mediante el mapeo de las sustituciones identificamos un aumento en el número de sustituciones relacionadas a diferentes sitios antigénicos, desde el año 2009 al 2013 y dicho aumento se correlacionó con una disminución en la eficacia teórica de la vacuna.

Con respecto a NA

Al igual que lo observado para HA, la mayoría de las sustituciones que ocurrieron en la proteína NA se localizaron en la superficie de la proteína, observándose además, un aumento en el número de sustituciones localizadas en sitios antigénicos desde el año 2009 al 2013.

Mediante el programa BepiPred se pudo identificar que todas las cepas analizadas difieren de la cepa vacunal en dos regiones de epítopes cuyas posiciones de aminoácidos fueron 102-103 y 351-352.

La mayoría de las sustituciones no afectarían el sitio de unión a la droga antiviral (Oseltamivir), ya que se localizaron a más de 3Å de distancia del sitio activo.

En análisis de los potenciales sitios de glicosilación reveló que todas las muestras analizadas comparten tres sitios de glicosilación con la cepa vacunal en el segmento génico HA, y siete sitios de glicosilación en el segmento génico NA. Logramos

identificar además, un nuevo sitio potencial de N-glicosilación en una cepa aislada en Brasil y la ausencia de dos sitios de N-glicosilación en cepas aisladas en Sudamérica.

Resaltamos la importancia de la utilización de tecnologías de secuenciación masiva en la vigilancia de cepas resistentes a las drogas antivirales ya que a pesar de no detectar las sustituciones asociadas a la resistencia al analizar la secuencia consenso obtenida por secuenciación de Sanger, dichas sustituciones fueron identificadas al aumentar la profundidad de la secuenciación. Asimismo logramos detectar cómo variantes minoritarias en el año 2009 y 2011, asociadas a sustituciones permisivas para la sustitución H275Y, pasaron a ser representadas en altas frecuencias para el año 2013. Estos resultados indican que actualmente los virus Influenza H1N1pdm son más permisivos a adquirir la sustitución H275Y, aumentando el riesgo de la emergencia de cepas resistentes y su dispersión a nivel mundial.

Con respecto al estudio de cuasiespecies aisladas de infecciones *in vivo*, logramos obtener de forma exitosa los stocks virales. Se logró optimizar el método de infección por vía oral, observando un incremento en la cantidad de genomas virales así como de partículas infectivas. El análisis de diversidad poblacional reveló la existencia de variantes genéticas específicas para cada uno de los órganos estudiados indicando la presencia de subpoblaciones del virus en los distintos compartimentos.

## **7. Referencias Bibliográficas**

1. Elena, S.F., *RNA virus genetic robustness: possible causes and some consequences*. *Curr Opin Virol*, 2012. **2**(5): p. 525-30.
2. Duffy, S., L.A. Shackelton, and E.C. Holmes, *Rates of evolutionary change in viruses: patterns and determinants*. *Nat Rev Genet*, 2008. **9**(4): p. 267-76.
3. Nagy, P.D. and A.E. Simon, *New Insights into the Mechanisms of RNA Recombination*. *Virology*, 1997. **235**(1): p. 1-9.
4. Simmonds, P. and J. Welch, *Frequency and dynamics of recombination within different species of human enteroviruses*. *J Virol*, 2006. **80**(1): p. 483-93.
5. Mikkelsen, J.G. and F.S. Pedersen, *Genetic reassortment and patch repair by recombination in retroviruses*. *J Biomed Sci*, 2000. **7**(2): p. 77-99.
6. Hahn, C.S., et al., *Western equine encephalitis virus is a recombinant virus*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1988. **85**(16): p. 5997-6001.
7. Fields, B.N., D.M. Knipe, and P.M. Howley, *Fields virology*. 2013, Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins.
8. Worobey, M. and E.C. Holmes, *Evolutionary aspects of recombination in RNA viruses*. *J Gen Virol*, 1999. **80 ( Pt 10)**: p. 2535-43.
9. Simon-Loriere, E. and E.C. Holmes, *Why do RNA viruses recombine?* *Nat Rev Microbiol*, 2011. **9**(8): p. 617-26.
10. Drake, J.W., *A constant rate of spontaneous mutation in DNA-based microbes*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1991. **88**(16): p. 7160-4.
11. Combe, M. and R. Sanjuan, *Variation in RNA virus mutation rates across host cells*. *PLoS Pathog*, 2014. **10**(1): p. e1003855.
12. Steinhauer, D.A., E. Domingo, and J.J. Holland, *Lack of evidence for proofreading mechanisms associated with an RNA virus polymerase*. *Gene*, 1992. **122**(2): p. 281-8.
13. Pfeiffer, J.K. and K. Kirkegaard, *A single mutation in poliovirus RNA-dependent RNA polymerase confers resistance to mutagenic nucleotide analogs via increased fidelity*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. **100**(12): p. 7289-94.
14. Arnold, J.J., et al., *Remote site control of an active site fidelity checkpoint in a viral RNA-dependent RNA polymerase*. *J Biol Chem*, 2005. **280**(27): p. 25706-16.
15. Korneeva, V.S. and C.E. Cameron, *Structure-function relationships of the viral RNA-dependent RNA polymerase: fidelity, replication speed, and initiation mechanism determined by a residue in the ribose-binding pocket*. *J Biol Chem*, 2007. **282**(22): p. 16135-45.
16. Smith, E.C., et al., *Coronaviruses lacking exoribonuclease activity are susceptible to lethal mutagenesis: evidence for proofreading and potential therapeutics*. *PLoS Pathog*, 2013. **9**(8): p. e1003565.
17. Sardanyes, J., R.V. Sole, and S.F. Elena, *Replication mode and landscape topology differentially affect RNA virus mutational load and robustness*. *J Virol*, 2009. **83**(23): p. 12579-89.
18. Chao, L., C.U. Rang, and L.E. Wong, *Distribution of spontaneous mutants and inferences about the replication mode of the RNA bacteriophage phi6*. *J Virol*, 2002. **76**(7): p. 3276-81.
19. Pita, J.S., et al., *Environment determines fidelity for an RNA virus replicase*. *J Virol*, 2007. **81**(17): p. 9072-7.
20. Mangeat, B., et al., *Broad antiretroviral defence by human APOBEC3G through lethal editing of nascent reverse transcripts*. *Nature*, 2003. **424**(6944): p. 99-103.
21. O'Hara, P.J., et al., *Vesicular stomatitis virus defective interfering particles can contain extensive genomic sequence rearrangements and base substitutions*. *Cell*, 1984. **36**(4): p. 915-24.

22. Seronello, S., et al., *Ethanol and reactive species increase basal sequence heterogeneity of hepatitis C virus and produce variants with reduced susceptibility to antivirals*. PLoS One, 2011. **6**(11): p. e27436.
23. Chen, R. and E.C. Holmes, *Avian influenza virus exhibits rapid evolutionary dynamics*. Mol Biol Evol, 2006. **23**(12): p. 2336-41.
24. Domingo, E., et al., *Nucleotide sequence heterogeneity of an RNA phage population*. Cell, 1978. **13**(4): p. 735-44.
25. Nowak, M.A., *What is a quasispecies?* Trends Ecol Evol, 1992. **7**(4): p. 118-21.
26. Eigen, M., *Viral quasispecies*. Sci Am, 1993. **269**(1): p. 42-9.
27. Eigen, M., *Selforganization of matter and the evolution of biological macromolecules*. Naturwissenschaften, 1971. **58**(10): p. 465-523.
28. Biebricher, C.K. and M. Eigen, *The error threshold*. Virus Res, 2005. **107**(2): p. 117-27.
29. Eigen, M. and P. Schuster, *The hypercycle. A principle of natural self-organization. Part A: Emergence of the hypercycle*. Naturwissenschaften, 1977. **64**(11): p. 541-65.
30. Holland, J., et al., *Rapid evolution of RNA genomes*. Science, 1982. **215**(4540): p. 1577-85.
31. Lauring, A.S. and R. Andino, *Quasispecies theory and the behavior of RNA viruses*. PLoS Pathog, 2010. **6**(7): p. e1001005.
32. Domingo, E., J. Sheldon, and C. Perales, *Viral quasispecies evolution*. Microbiol Mol Biol Rev, 2012. **76**(2): p. 159-216.
33. Holland, J. and E. Domingo, *Origin and evolution of viruses*. Virus Genes, 1998. **16**(1): p. 13-21.
34. Domingo, E., L. Menendez-Arias, and J.J. Holland, *RNA virus fitness*. Rev Med Virol, 1997. **7**(2): p. 87-96.
35. Lauring, A.S. and R. Andino, *Exploring the fitness landscape of an RNA virus by using a universal barcode microarray*. J Virol, 2011. **85**(8): p. 3780-91.
36. Acevedo, A., L. Brodsky, and R. Andino, *Mutational and fitness landscapes of an RNA virus revealed through population sequencing*. Nature, 2014. **505**(7485): p. 686-90.
37. Wright, C.F., et al., *Beyond the consensus: dissecting within-host viral population diversity of foot-and-mouth disease virus by using next-generation genome sequencing*. J Virol, 2011. **85**(5): p. 2266-75.
38. Borderia, A.V., K.A. Stapleford, and M. Vignuzzi, *RNA virus population diversity: implications for inter-species transmission*. Curr Opin Virol, 2011. **1**(6): p. 643-8.
39. Vignuzzi, M., et al., *Quasispecies diversity determines pathogenesis through cooperative interactions in a viral population*. Nature, 2006. **439**(7074): p. 344-8.
40. Navas, S., et al., *Genetic diversity and tissue compartmentalization of the hepatitis C virus genome in blood mononuclear cells, liver, and serum from chronic hepatitis C patients*. J Virol, 1998. **72**(2): p. 1640-6.
41. Isakov, O., et al., *Deep sequencing analysis of viral infection and evolution allows rapid and detailed characterization of viral mutant spectrum*. Bioinformatics, 2015. **31**(13): p. 2141-50.
42. Gong, L., et al., *Comparison of Next-Generation Sequencing and Clone-Based Sequencing in Analysis of Hepatitis B Virus Reverse Transcriptase Quasispecies Heterogeneity*. Journal of Clinical Microbiology, 2013. **51**(12): p. 4087-4094.
43. Beaucourt, S., et al., *Isolation of Fidelity Variants of RNA Viruses and Characterization of Virus Mutation Frequency*. Journal of Visualized Experiments : JoVE, 2011(52): p. 2953.

44. Gasparini, R., et al., *Clinical and socioeconomic impact of seasonal and pandemic influenza in adults and the elderly*. Human Vaccines & Immunotherapeutics, 2012. **8**(1): p. 21-28.
45. Webster, R.G., *While awaiting the next pandemic of influenza A*. BMJ : British Medical Journal, 1994. **309**(6963): p. 1179-1180.
46. Holmes, E.C., *RNA virus genomics: a world of possibilities*. The Journal of Clinical Investigation, 2009. **119**(9): p. 2488-2495.
47. Wu, Y., et al., *Bat-derived influenza-like viruses H17N10 and H18N11*. Trends Microbiol, 2014. **22**(4): p. 183-91.
48. Webster, R.G., et al., *Evolution and ecology of influenza A viruses*. Microbiological Reviews, 1992. **56**(1): p. 152-179.
49. Webster, R.G. and E.A. Govorkova, *Continuing challenges in influenza*. Ann N Y Acad Sci, 2014. **1323**: p. 115-39.
50. Gamblin, S.J. and J.J. Skehel, *Influenza hemagglutinin and neuraminidase membrane glycoproteins*. J Biol Chem, 2010. **285**(37): p. 28403-9.
51. Medina, R.A. and A. Garcia-Sastre, *Influenza A viruses: new research developments*. Nat Rev Microbiol, 2011. **9**(8): p. 590-603.
52. Hutchinson, E.C. and E. Fodor, *Transport of the influenza virus genome from nucleus to nucleus*. Viruses, 2013. **5**(10): p. 2424-46.
53. Taubenberger, J.K. and J.C. Kash, *Influenza virus evolution, host adaptation, and pandemic formation*. Cell Host Microbe, 2010. **7**(6): p. 440-51.
54. Bush, R.M., et al., *Positive selection on the H3 hemagglutinin gene of human influenza virus A*. Mol Biol Evol, 1999. **16**(11): p. 1457-65.
55. Treanor, J., *Weathering the influenza vaccine crisis*. N Engl J Med, 2004. **351**(20): p. 2037-40.
56. Dugan, V.G., et al., *The evolutionary genetics and emergence of avian influenza viruses in wild birds*. PLoS Pathog, 2008. **4**(5): p. e1000076.
57. Nicholls, H., *Pandemic influenza: the inside story*. PLoS Biol, 2006. **4**(2): p. e50.
58. Taubenberger, J.K., *Influenza hemagglutinin attachment to target cells: 'birds do it, we do it...'*. Future Virol, 2006. **1**(4): p. 415-418.
59. Vana, G. and K.M. Westover, *Origin of the 1918 Spanish influenza virus: a comparative genomic analysis*. Mol Phylogenet Evol, 2008. **47**(3): p. 1100-10.
60. Taubenberger, J.K. and D.M. Morens, *Influenza: the once and future pandemic*. Public Health Rep, 2010. **125 Suppl 3**: p. 16-26.
61. Neumann, G., T. Noda, and Y. Kawaoka, *Emergence and pandemic potential of swine-origin H1N1 influenza virus*. Nature, 2009. **459**(7249): p. 931-9.
62. Garten, R.J., et al., *Antigenic and genetic characteristics of swine-origin 2009 A(H1N1) influenza viruses circulating in humans*. Science, 2009. **325**(5937): p. 197-201.
63. Girard, M.P., et al., *The 2009 A (H1N1) influenza virus pandemic: A review*. Vaccine, 2010. **28**(31): p. 4895-902.
64. Louie, J.K., et al., *Factors associated with death or hospitalization due to pandemic 2009 influenza A(H1N1) infection in California*. Jama, 2009. **302**(17): p. 1896-902.
65. Dawood, F.S., et al., *Emergence of a novel swine-origin influenza A (H1N1) virus in humans*. N Engl J Med, 2009. **360**(25): p. 2605-15.
66. Nelson, M., et al., *The early diversification of influenza A/H1N1pdm*. PLoS Currents, 2009. **1**: p. RRN1126.
67. Potdar, V.A., et al., *Genetic characterization of the influenza A pandemic (H1N1) 2009 virus isolates from India*. PLoS One, 2010. **5**(3): p. e9693.

68. Nichol, K.L., et al., *Effectiveness of influenza vaccine in the community-dwelling elderly*. N Engl J Med, 2007. **357**(14): p. 1373-81.
69. Hak, E., et al., *Clinical effectiveness of influenza vaccination in persons younger than 65 years with high-risk medical conditions: the PRISMA study*. Arch Intern Med, 2005. **165**(3): p. 274-80.
70. Goni, N., et al., *Influenza B viruses isolated in Uruguay during the 2002-2005 seasons: genetic relations and vaccine strain match*. Virus Res, 2007. **123**(1): p. 100-4.
71. Goni, N., J. Russi, and J. Cristina, *Human influenza A viruses isolated in South America: genetic relations, adamantane resistance and vaccine strain match*. Infect Genet Evol, 2009. **9**(2): p. 229-34.
72. Goni, N., et al., *Phylogenetic analysis of pandemic 2009 influenza A virus circulating in the South American region: genetic relationships and vaccine strain match*. Arch Virol, 2011. **156**(1): p. 87-94.
73. Throsby, M., et al., *Heterosubtypic Neutralizing Monoclonal Antibodies Cross-Protective against H5N1 and H1N1 Recovered from Human IgM(+) Memory B Cells*. PLoS ONE, 2008. **3**(12): p. e3942.
74. Webster, R.G. and E.A. Govorkova, *Continuing challenges in influenza*. Annals of the New York Academy of Sciences, 2014. **1323**(1): p. 115-139.
75. Ekiert, D.C. and I.A. Wilson, *Broadly neutralizing antibodies against influenza virus and prospects for universal therapies*. Current Opinion in Virology, 2012. **2**(2): p. 134-141.
76. Younkin, S.W., et al., *Reduction in fever and symptoms in young adults with influenza A/Brazil/78 H1N1 infection after treatment with aspirin or amantadine*. Antimicrob Agents Chemother, 1983. **23**(4): p. 577-82.
77. Gubareva, L.V., *Molecular mechanisms of influenza virus resistance to neuraminidase inhibitors*. Virus Res, 2004. **103**(1-2): p. 199-203.
78. Wang, C., et al., *Ion channel activity of influenza A virus M2 protein: characterization of the amantadine block*. J Virol, 1993. **67**(9): p. 5585-94.
79. Van Voris, L.P. and P.M. Newell, *Antivirals for the chemoprophylaxis and treatment of influenza*. Semin Respir Infect, 1992. **7**(1): p. 61-70.
80. Simonsen, L., et al., *The genesis and spread of reassortment human influenza A/H3N2 viruses conferring adamantane resistance*. Mol Biol Evol, 2007. **24**(8): p. 1811-20.
81. Saito, R., et al., *Frequency of amantadine-resistant influenza A viruses during two seasons featuring cocirculation of H1N1 and H3N2*. J Clin Microbiol, 2003. **41**(5): p. 2164-5.
82. Bright, R.A., et al., *Incidence of adamantane resistance among influenza A (H3N2) viruses isolated worldwide from 1994 to 2005: a cause for concern*. Lancet, 2005. **366**(9492): p. 1175-81.
83. Hata, M., et al., *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, 2007. **60**(4): p. 202-4.
84. Shinde, V., et al., *Triple-reassortant swine influenza A (H1) in humans in the United States, 2005-2009*. N Engl J Med, 2009. **360**(25): p. 2616-25.
85. *Update: drug susceptibility of swine-origin influenza A (H1N1) viruses, April 2009*. MMWR Morb Mortal Wkly Rep, 2009. **58**(16): p. 433-5.
86. Ramirez-Gonzalez, J.E., et al., *Oseltamivir-resistant pandemic (H1N1) 2009 virus, Mexico*. Emerg Infect Dis, 2011. **17**(2): p. 283-6.
87. Moscona, A., *Oseltamivir Resistance — Disabling Our Influenza Defenses*. New England Journal of Medicine, 2005. **353**(25): p. 2633-2636.

88. McKimm-Breschkin, J.L., *Influenza neuraminidase inhibitors: antiviral action and mechanisms of resistance*. Influenza Other Respir Viruses, 2013. **7 Suppl 1**: p. 25-36.
89. Varghese, J.N., et al., *Drug design against a shifting target: a structural basis for resistance to inhibitors in a variant of influenza virus neuraminidase*. Structure, 1998. **6(6)**: p. 735-46.
90. Mendel, D.B., et al., *Oral administration of a prodrug of the influenza virus neuraminidase inhibitor GS 4071 protects mice and ferrets against influenza infection*. Antimicrob Agents Chemother, 1998. **42(3)**: p. 640-6.
91. Wang, M.Z., C.Y. Tai, and D.B. Mendel, *Mechanism by which mutations at his274 alter sensitivity of influenza A virus N1 neuraminidase to oseltamivir carboxylate and zanamivir*. Antimicrob Agents Chemother, 2002. **46(12)**: p. 3809-16.
92. Weinstock, D.M., L.V. Gubareva, and G. Zuccotti, *Prolonged shedding of multidrug-resistant influenza A virus in an immunocompromised patient*. N Engl J Med, 2003. **348(9)**: p. 867-8.
93. Gubareva, L.V., et al., *Selection of influenza virus mutants in experimentally infected volunteers treated with oseltamivir*. J Infect Dis, 2001. **183(4)**: p. 523-31.
94. *Update: influenza activity - United States, September 28, 2008--January 31, 2009*. MMWR Morb Mortal Wkly Rep, 2009. **58(5)**: p. 115-9.
95. Bloom, J.D., L.I. Gong, and D. Baltimore, *Permissive Secondary Mutations Enable the Evolution of Influenza Oseltamivir Resistance*. Science (New York, N.Y.), 2010. **328(5983)**: p. 1272-1275.
96. Inoue, M., et al., *Emergence of oseltamivir-resistant pandemic (H1N1) 2009 virus within 48 hours*. Emerg Infect Dis, 2010. **16(10)**: p. 1633-6.
97. van der Vries, E., F.F. Stelma, and C.A. Boucher, *Emergence of a multidrug-resistant pandemic influenza A (H1N1) virus*. N Engl J Med, 2010. **363(14)**: p. 1381-2.
98. Le, Q.M., et al., *Avian flu: isolation of drug-resistant H5N1 virus*. Nature, 2005. **437(7062)**: p. 1108.
99. Yen, H.L., et al., *Neuraminidase inhibitor-resistant recombinant A/Vietnam/1203/04 (H5N1) influenza viruses retain their replication efficiency and pathogenicity in vitro and in vivo*. J Virol, 2007. **81(22)**: p. 12418-26.
100. Kiso, M., et al., *Resistant influenza A viruses in children treated with oseltamivir: descriptive study*. Lancet, 2004. **364(9436)**: p. 759-65.
101. Morlighem, J.E., et al., *Mutation analysis of 2009 pandemic influenza A(H1N1) viruses collected in Japan during the peak phase of the pandemic*. PLoS One, 2011. **6(4)**: p. e18956.
102. Benedetti, E., et al., *Influenza virus surveillance in Argentina during the 2012 season: antigenic characterization, genetic analysis and antiviral susceptibility*. Epidemiol Infect, 2015: p. 1-17.
103. Hurt, A.C., et al., *Increased detection in Australia and Singapore of a novel influenza A(H1N1)2009 variant with reduced oseltamivir and zanamivir sensitivity due to a S247N neuraminidase mutation*. Euro Surveill, 2011. **16(23)**.
104. Hurt, A.C., et al., *Characteristics of a Widespread Community Cluster of H275Y Oseltamivir-Resistant A(H1N1)pdm09 Influenza in Australia*. The Journal of Infectious Diseases, 2012. **206(2)**: p. 148-157.
105. Butler, J., et al., *Estimating the Fitness Advantage Conferred by Permissive Neuraminidase Mutations in Recent Oseltamivir-Resistant A(H1N1)pdm09 Influenza Viruses*. PLoS Pathogens, 2014. **10(4)**: p. e1004065.

106. Bloom, J.D., J.S. Nayak, and D. Baltimore, *A Computational-Experimental Approach Identifies Mutations That Enhance Surface Expression of an Oseltamivir-Resistant Influenza Neuraminidase*. PLoS ONE, 2011. **6**(7): p. e22201.
107. Wenzel, J.J., et al., *Analytical performance determination and clinical validation of the novel Roche RealTime Ready Influenza A/H1N1 Detection Set*. J Clin Microbiol, 2010. **48**(9): p. 3088-94.
108. Tamura, K., et al., *MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods*. Molecular Biology and Evolution, 2011. **28**(10): p. 2731-2739.
109. Keane, T.M., et al., *Assessment of methods for 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, 2006. **6**: p. 29.
110. Guindon, S., et al., *PHYML Online—a web server for fast maximum likelihood-based phylogenetic inference*. Nucleic Acids Research, 2005. **33**(Web Server issue): p. W557-W559.
111. Anisimova, M. and O. Gascuel, *Approximate likelihood-ratio test for branches: A fast, accurate, and powerful alternative*. Syst Biol, 2006. **55**(4): p. 539-52.
112. Deem, M.W. and K. Pan, *The epitope regions of H1-subtype influenza A, with application to vaccine efficacy*. Protein Eng Des Sel, 2009. **22**(9): p. 543-6.
113. Gupta, V., D.J. Earl, and M.W. Deem, *Quantifying influenza vaccine efficacy and antigenic distance*. Vaccine, 2006. **24**(18): p. 3881-8.
114. Smith, D.J., et al., *Mapping the antigenic and genetic evolution of influenza virus*. Science, 2004. **305**(5682): p. 371-6.
115. Thompson, J.D., D.G. Higgins, and T.J. Gibson, *CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice*. Nucleic Acids Res, 1994. **22**(22): p. 4673-80.
116. Stevens, J., et al., *Structure of the uncleaved human H1 hemagglutinin from the extinct 1918 influenza virus*. Science, 2004. **303**(5665): p. 1866-70.
117. Xu, R., et al., *Structural basis of preexisting immunity to the 2009 H1N1 pandemic influenza virus*. Science, 2010. **328**(5976): p. 357-60.
118. Sun, S., et al., *Glycosylation site alteration in the evolution of influenza A (H1N1) viruses*. PLoS One, 2011. **6**(7): p. e22844.
119. Schulze, I.T., *Effects of glycosylation on the properties and functions of influenza virus hemagglutinin*. J Infect Dis, 1997. **176** Suppl 1: p. S24-8.
120. Oliveira, M.J., et al., *Molecular findings from influenza A(H1N1)pdm09 detected in patients from a Brazilian equatorial region during the pandemic period*. Mem Inst Oswaldo Cruz, 2014. **109**(7): p. 912-7.
121. Sant'Anna, F.H., et al., *Genomic analysis of pandemic and post-pandemic influenza A pH1N1 viruses isolated in Rio Grande do Sul, Brazil*. Arch Virol, 2014. **159**(4): p. 621-30.
122. Nelson, M.I., et al., *Phylogeography of the spring and fall waves of the H1N1/09 pandemic influenza virus in the United States*. J Virol, 2011. **85**(2): p. 828-34.
123. Dapat, I.C., et al., *Genetic Characterization of Human Influenza Viruses in the Pandemic (2009–2010) and Post-Pandemic (2010–2011) Periods in Japan*. PLoS ONE, 2012. **7**(6): p. e36455.
124. Dakhve, M., et al., *Whole-Genome Sequence Analysis of Postpandemic Influenza A(H1N1)pdm09 Virus Isolates from India*. Genome Announcements, 2013. **1**(5): p. e00727-13.
125. El Moussi, A., et al., *Genetic diversity of HA1 domain of heammagglutinin gene of influenza A(H1N1)pdm09 in Tunisia*. Virol J, 2013. **10**: p. 150.

126. Guldemir, D., et al., *Monitoring genetic diversity of influenza A(H1N1)pdm09 virus circulating during the post-pandemic period in Turkey*. Jpn J Infect Dis, 2013. **66**(4): p. 299-305.
127. Russo, M.L., et al., *Antigenic and genomic characterization of human influenza A and B viruses circulating in Argentina after the introduction of influenza A(H1N1)pdm09*. J Med Microbiol, 2014. **63**(Pt 12): p. 1626-37.
128. Resende, P.C., et al., *Phylogenetic analyses of influenza A (H1N1)pdm09 hemagglutinin gene during and after the pandemic event in Brazil*. Infect Genet Evol, 2015. **36**: p. 147-155.
129. Comas, V., et al., *Phylogenetic analysis of the neuraminidase gene of pandemic H1N1 influenza A virus circulating in the South American region*. Virus Res, 2015. **197**: p. 1-7.
130. Glinsky, G.V., *Genomic analysis of pandemic (H1N1) 2009 reveals association of increasing disease severity with emergence of novel hemagglutinin mutations*. Cell Cycle, 2010. **9**(5): p. 958-70.
131. Yang, H., P. Carney, and J. Stevens, *Structure and Receptor binding properties of a pandemic H1N1 virus hemagglutinin*. PLoS Currents, 2010. **2**: p. RRN1152.
132. Liu, Y., et al., *Altered Receptor Specificity and Cell Tropism of D222G Hemagglutinin Mutants Isolated from Fatal Cases of Pandemic A(H1N1) 2009 Influenza Virus*. Journal of Virology, 2010. **84**(22): p. 12069-12074.
133. Chutinimitkul, S., et al., *Virulence-Associated Substitution D222G in the Hemagglutinin of 2009 Pandemic Influenza A(H1N1) Virus Affects Receptor Binding*. Journal of Virology, 2010. **84**(22): p. 11802-11813.
134. Nelson, M.I., et al., *Multiple Reassortment Events in the Evolutionary History of H1N1 Influenza A Virus Since 1918*. PLoS Pathogens, 2008. **4**(2): p. e1000012.
135. Su, Y.C. and J. Bahl, *Phylodynamics of H1N1/2009 influenza reveals the transition from host adaptation to immune-driven selection*. 2015. **6**: p. 7952.
136. Maurer-Stroh, S., et al., *Mapping the sequence mutations of the 2009 H1N1 influenza A virus neuraminidase relative to drug and antibody binding sites*. Biol Direct, 2009. **4**: p. 18; discussion 18.
137. Nelson, M.I. and E.C. Holmes, *The evolution of epidemic influenza*. Nat Rev Genet, 2007. **8**(3): p. 196-205.
138. Dixit, R., et al., *Emergence of oseltamivir resistance: control and management of influenza before, during and after the pandemic*. Infect Disord Drug Targets, 2013. **13**(1): p. 34-45.
139. Abed, Y., M. Baz, and G. Boivin, *Impact of neuraminidase mutations conferring influenza resistance to neuraminidase inhibitors in the N1 and N2 genetic backgrounds*. Antivir Ther, 2006. **11**(8): p. 971-6.
140. Barrero, P.R., et al., *Genetic and phylogenetic analyses of influenza A H1N1pdm virus in Buenos Aires, Argentina*. J Virol, 2011. **85**(2): p. 1058-66.
141. Souza, T.M.L., et al., *Detection of Oseltamivir-Resistant Pandemic Influenza A(H1N1)pdm2009 in Brazil: Can Community Transmission Be Ruled Out?* PLoS ONE, 2013. **8**(11): p. e80081.
142. Kelso, A. and A.C. Hurt, *The ongoing battle against influenza: Drug-resistant influenza viruses: why fitness matters*. Nat Med, 2012. **18**(10): p. 1470-1.
143. Correia, V., et al., *Influenza A(H1N1)pdm09 resistance and cross-decreased susceptibility to oseltamivir and zanamivir antiviral drugs*. J Med Virol, 2015. **87**(1): p. 45-56.
144. Palacios, G. and M.S. Oberste, *Enteroviruses as agents of emerging infectious diseases*. J Neurovirol, 2005. **11**(5): p. 424-33.

145. Kandolf, R., et al., *Molecular studies on enteroviral heart disease: patterns of acute and persistent infections*. Eur Heart J, 1991. **12 Suppl D**: p. 49-55.
146. Li, X., et al., *Identification of the interaction of VP1 with GM130 which may implicate in the pathogenesis of CVB3-induced acute pancreatitis*. Scientific Reports, 2015. **5**: p. 13324.
147. Oldstone, M.B., *Viral persistence*. Cell, 1989. **56**(4): p. 517-20.

## **8. Anexo**

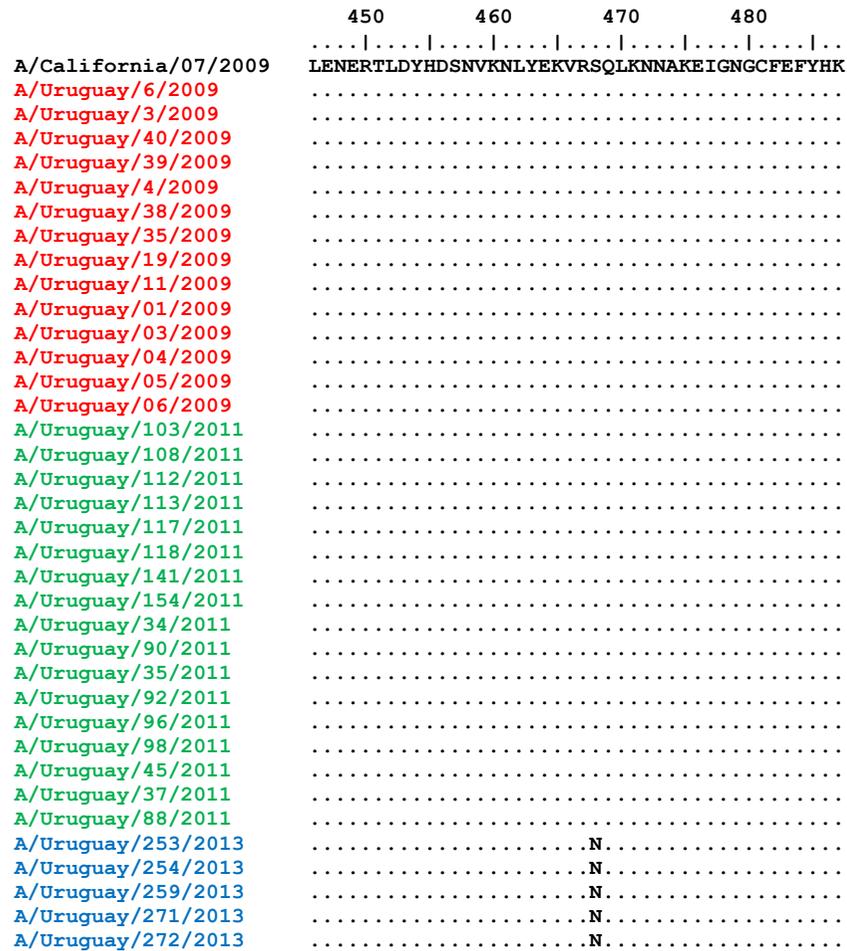
## **8.1 Anexo 1-Capítulo I**



	210	220	230	240	250	260	270	280	290	300	310	320
A/California/07/2009	OSLYQNADAYV	FGSS	YSKKFKPEIAIRPKV	RDE	EGRMNYYWTL	ER	QDKITFEATGNLVVPRYAFAMERNAGSGII	ISDTPVHDCNTTCQT	PKGAIN	NTSLPFQNIHPITIGKCPKYVK		
A/Uruguay/6/2009		T		Q								
A/Uruguay/3/2009		T		Q								
A/Uruguay/40/2009		T		Q								
A/Uruguay/39/2009		T		Q								
A/Uruguay/4/2009		T		Q								
A/Uruguay/38/2009		T		Q								
A/Uruguay/35/2009		T		Q								
A/Uruguay/19/2009		T		Q								
A/Uruguay/11/2009		T		Q								
A/Uruguay/01/2009		T		Q								
A/Uruguay/03/2009		T		Q								
A/Uruguay/04/2009		T		Q								
A/Uruguay/05/2009		T		Q								
A/Uruguay/06/2009		T		Q								
A/Uruguay/103/2011		T.K	.V	Q		L						
A/Uruguay/108/2011		T.K	.V	Q		L						
A/Uruguay/112/2011		T.K	.V	Q		L						
A/Uruguay/113/2011		T.K	.V	Q		L						
A/Uruguay/117/2011		T.K	.V	Q		L						
A/Uruguay/118/2011		T.K	.V	Q		L						
A/Uruguay/141/2011		T.K	.V	Q		L						
A/Uruguay/154/2011		T.K	.V	Q		L						
A/Uruguay/34/2011		T.K	.V	Q		L						
A/Uruguay/90/2011		T.K	.V	Q		L						
A/Uruguay/35/2011		T.K	.V	Q		L						
A/Uruguay/92/2011		T.K	.V	Q		L						
A/Uruguay/96/2011		T.K	.V	Q		L						
A/Uruguay/98/2011		T.K	.V	Q		L						
A/Uruguay/45/2011		T.K	.V	Q		L						
A/Uruguay/37/2011		T.K	.V	Q		L						
A/Uruguay/88/2011		T.K	.V	Q		L						
A/Uruguay/253/2013		T		Q			T			E		
A/Uruguay/254/2013		T		Q			T			E		
A/Uruguay/259/2013		T		Q			T			E		
A/Uruguay/271/2013		T		Q			T			E		
A/Uruguay/272/2013		T	T.K	Q								



HA2



**Figura 1-anexo1. Alineamiento de secuencias de aminoácidos correspondiente al segmento génico HA de cepas aisladas en Uruguay.** El nombre de las muestras se indica a la izquierda de la figura. Las secuencias de aminoácidos se indican con el código de una letra. La identidad de la cepa de referencia, cepa vacunal A/California/07/2009 CY121680, se indica mediante un guion. En la parte superior del alineamiento se indica en diferentes colores los distintos sitios antigénicos, en violeta Sa, en cian Sb, en verde Ca1 y Ca2 y en azul Cb y en amarillo los sitios involucrados en la unión al receptor.

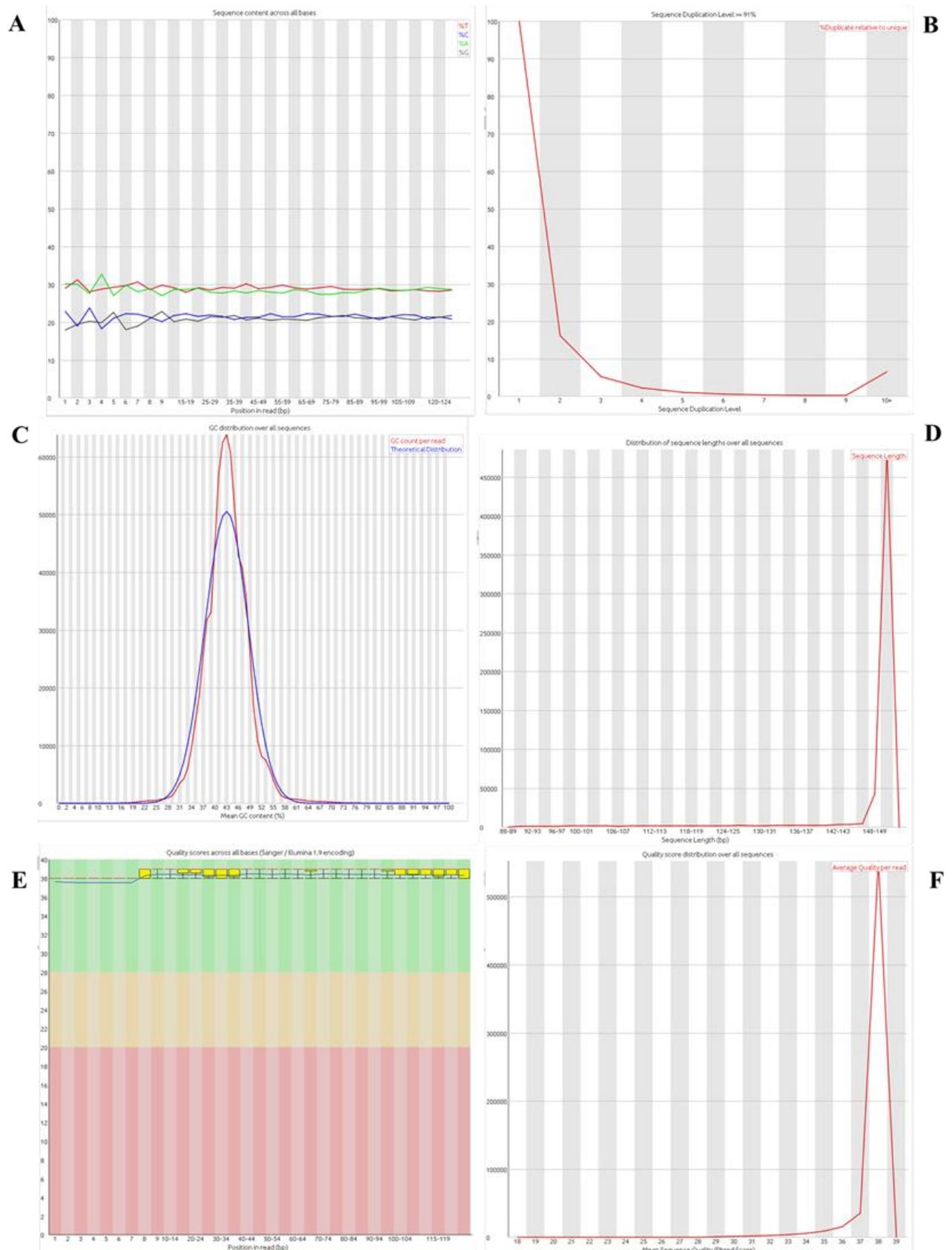


	180	190	200	210	220	230	240	250	260	270	280	290
A/California/07/2009	.I	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
A/Uruguay/18/2009	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
A/Uruguay/319/2009	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
A/Uruguay/345/2009	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
A/Uruguay/369/2009	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
A/Uruguay/39/2009	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
A/Uruguay/323/2009	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
A/Uruguay/123/2009	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
A/Uruguay/479/2009	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
A/Uruguay/11/2009	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
A/Uruguay/5/2009	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
A/Uruguay/518/2009	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
A/Uruguay/58/2009	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
A/Uruguay/605/2009	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
A/Uruguay/549/2009	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
A/Uruguay/57/2009	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
A/Uruguay/495/2009	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G.
A/Uruguay/70/2009	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
A/Uruguay/61/2009	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
A/Uruguay/78/2009	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
A/Uruguay/689/2009	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
A/Uruguay/856/2009	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	K.	.
A/Uruguay/825/2009	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
A/Uruguay/835/2009	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
A/Uruguay/DR/2009	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
A/Uruguay/842/2009	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
A/Uruguay/815/2009	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
A/Uruguay/878/2009	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
A/Uruguay/905/2009	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
A/Uruguay/890/2009	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
A/Uruguay/76/2009	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
A/Uruguay/PF/2009	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
A/Uruguay/01/2009	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
A/Uruguay/03/2009	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
A/Uruguay/04/2009	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
A/Uruguay/06/2009	.	Q.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
A/Uruguay/108/2011	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
A/Uruguay/112/2011	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
A/Uruguay/113/2011	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
A/Uruguay/45/2011	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
A/Uruguay/117/2011	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
A/Uruguay/37/2011	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
A/Uruguay/92/2011	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
A/Uruguay/90/2011	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
A/Uruguay/88/2011	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
A/Uruguay/98/2011	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
A/Uruguay/48/2011	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
A/Uruguay/118/2011	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
A/Uruguay/96/2011	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
A/Uruguay/35/2011	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
A/Uruguay/141/2011	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
A/Uruguay/154/2011	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
A/Uruguay/103/2011	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
A/Uruguay/253/2013	.	.	S.	.	R.	.	.	I.	.	.	.	D.
A/Uruguay/254/2013	.	.	S.	.	R.	.	.	I.	.	.	.	D.
A/Uruguay/259/2013	.	.	S.	.	R.	.	.	I.	.	.	.	D.
A/Uruguay/271/2013	.	.	S.	.	R.	.	.	I.	.	.	.	D.
A/Uruguay/272/2013	.	.	S.	.	R.	.	.	I.	.	.	.	D.

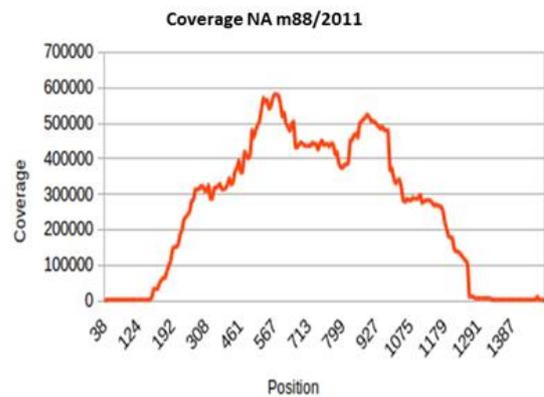
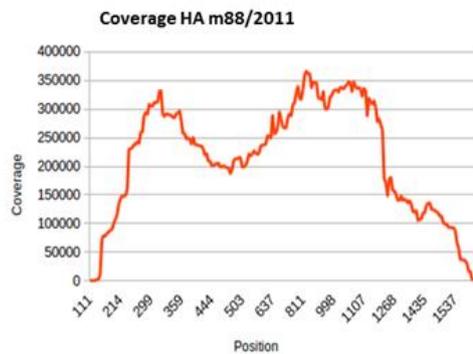
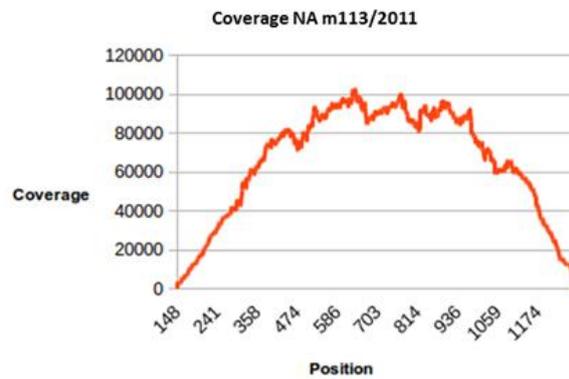
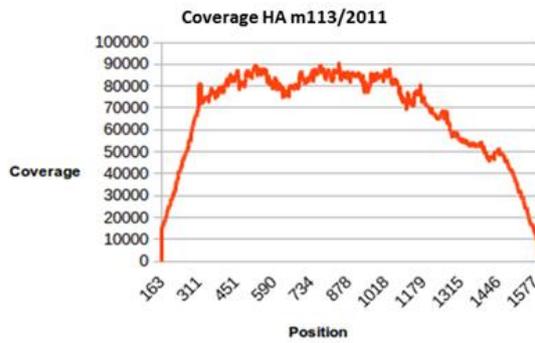
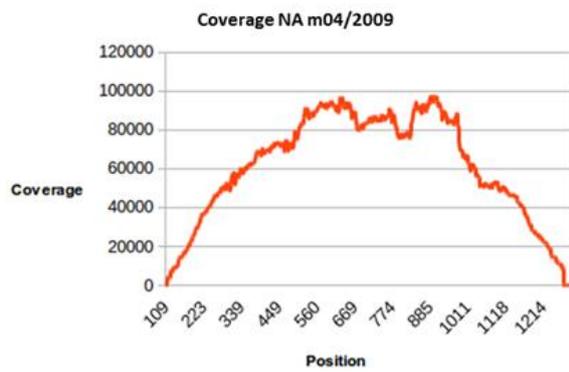
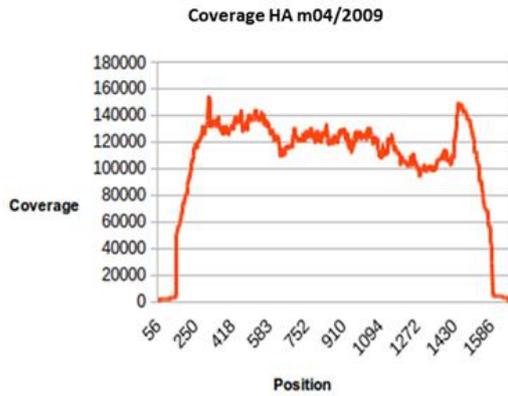
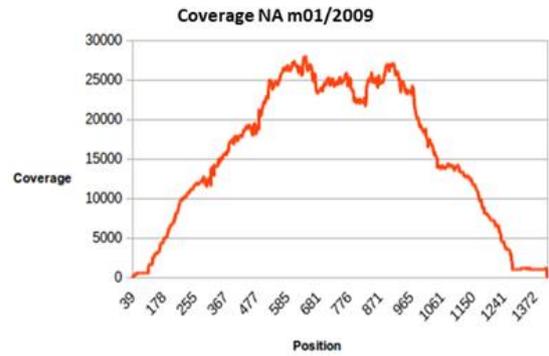
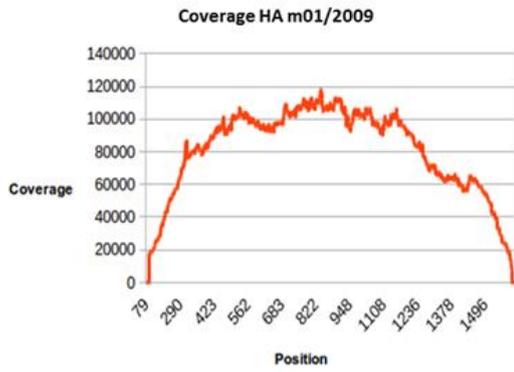


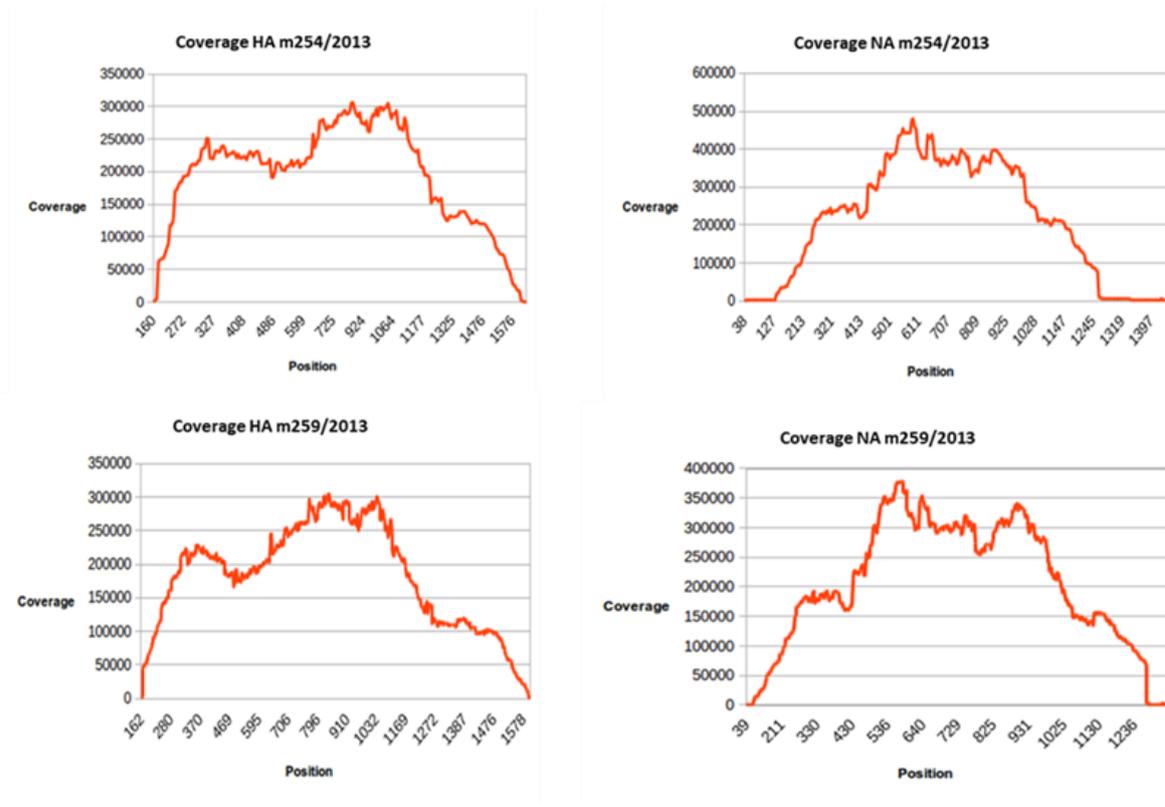


## **8.2 Anexo 2-Capítulo II**



**Figura 1-anexo 2. Validación del pre-procesamiento de los reads.** En el panel A) porcentaje de cada nucleótido en los reads B) porcentaje de secuencias repetidas C) distribución GC por base D) cantidad de read vs el largo en pb E) calidad de read vs posición F) calidad de read vs cantidad.





**Figura 2-anexo 2. Gráfico de la cobertura a lo largo de los segmentos génicos analizados.** Representación de la cobertura en función de la posición génica de HA se muestra en el lado izquierdo; a la derecha se ve la cobertura para el gen NA.

