



INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL

“PEDRO KOURÍ”

Vice-Dirección de Microbiología

Departamento de Virología

**“Caracterización molecular de los virus influenza A y B en Cuba
durante el período 2006-2010 y de marcadores inmunológicos
relacionados a la gravedad de la enfermedad”**

Tesis presentada en opción al grado científico de Doctor en Ciencias de la Salud

Autor: Lic. Alexander Piñón Ramos, MsC

Tutores: Prof. Odalys Valdés Ramírez, DrC

Prof. Clara Savón Valdés, DrC

Prof. Belsy Acosta Herrera, DrC

La Habana

2013

"Todos somos científicos cuando somos niños, pero al crecer, solo algunos conservan un poco de esa curiosidad que es la madre de la ciencia"

Juan Aguilar M
Biólogo teórico

A mis padres y hermanos

A Migue

A mi familia y amigos

LISTADO DE ABREVIATURAS

AG: aparato de Golgi

AP: altamente patogénico

ARN: ácido ribonucleico

ARNc: ARN complementario

ARNm: ARN mensajero

ARNv: ARN viral

AS: ácido siálico

BM2: proteína de membrana codificada por un marco de lectura alternativo +2 del segmento 7 del virus influenza B (del inglés, membrane protein in a +2 alternate reading frame influenza B segment 7)

Bootstrap: re-muestreo (del inglés, re-sampling)

BPP: probabilidad posterior Bayesiana (del inglés, Bayesian posterior probability)

C-2: carbono 2

C-3: carbono 3

C-6: carbono 6

Cap: caperuza

CCR5: receptor tipo 5 para quimiocinas CC

CCR5 Δ 32: delección de 32 pares de bases del CCR5

CM2: proteína menor de envoltura (del inglés, minor envelope protein)

ENF: exudado nasofaríngeo

ETI: enfermedad tipo influenza

GISN: Red Global de Vigilancia de Influenza (del inglés, Global Influenza Surveillance Network)

H5N1-IAAP: influenza aviar H5N1 altamente patogénica

H7N7-IAAP: influenza aviar H7N7 altamente patogénica

HA: proteína hemaglutinina

HEF: proteína de fusión hemaglutinina-esterasa (del inglés, hemagglutinin-esterase-fusion)

IAAP: influenza aviar altamente patogénica

IFN: interferón

IL: interleucinas

I-N: Influenza y neumonía

INAs: inhibidores de la neuraminidasa

IP-10 o CXCL10: proteína inducible IFN γ de 10kDa

IRA: infección respiratoria aguda

IRAG: infección respiratoria aguda grave

LNRI: Laboratorio Nacional de Referencia de Influenza

LØT: linfocito T

M: proteína matriz

M2: proteína matriz 2

MCC: credibilidad máxima de grupos (del inglés, Maximun clade credibility)

MCP1 o CCL2: proteína quimo atrayente de monocitos (del inglés, monocyte chemotactic protein)

MINSAP: Ministerio de Salud Pública

MØ: macrófago

NA: proteína neuraminidasa

NB: proteína matriz codificada por un marco de lectura alternativo -1 del segmento 6 del virus influenza B (del inglés, matrix protein in a -1 alternate reading frame influenza B segment 6)

NEP o NS2: proteína de exportación nuclear o proteína no estructural 2 (del inglés, nuclear export protein or nonstructural protein 2)

NIC: Centro Nacional de Influenza (del inglés, National Influenza Centre)

NLRs: receptores tipo NOD (del inglés, NOD-like receptor)

NLSs: señales de localización nuclear (del inglés, nuclear localization signals)

NP: nucleoproteína (del inglés, nucleoprotein)

OE: ola epidémica

OMS: Organización Mundial de la Salud

PA: polimerasa ácida (del inglés, polymerase acidic)

PAMPs: patrones moleculares asociados a patógenos (del inglés, pathogen-associated molecular patterns)

pb: pares de base

PB1 y PB2: polimerasas básicas 1 y 2 (del inglés, polymerase basic)

PB1-F2: pequeña proteína accesoria (del inglés, accessory protein)

PNPC: Programa Nacional de Prevención y Control

PRRs: receptores de reconocimiento de patrones (del inglés, pathogen recognition receptors)

RANTES/CCL5: quimiocina expresada y secretada por las células T normales reguladas tras la activación (del inglés, regulated upon activation, normal T-cell expressed and secreted)

RCP: reacción en cadena de la polimerasa

RE: retículo endoplasmático

RIG-I: ácido retinoico inducible asociado al gen I (del inglés, retinoic acid-inducible gene-I)

RNP: ribonucleoproteína (del inglés, ribonucleoprotein)

SARS: síndrome respiratorio agudo severo (del inglés, severe acute respiratory syndrome)

SE: semana epidemiológica

Th1: célula T auxiliadora (del inglés, helper T lymphocyte-1)

TLR: receptores tipo toll (del inglés, Toll-like receptor)

TMRCA: tiempo del ancestro común más reciente (del inglés, time to most recent common ancestor)

TR: tracto respiratorio

TRB: tracto respiratorio bajo

TR-RCP: transcripción reversa-reacción en cadena de la polimerasa

TRS: tracto respiratorio superior

VIH: virus de la inmunodeficiencia humana

VNO: virus del Nilo Occidental

VSR: virus sincitial respiratorio

SÍNTESIS

Se presentan evidencias sobre la circulación de diferentes variantes genéticas de los virus influenza A y B en Cuba y de la relación de marcadores de la respuesta inmune del hospedero con la severidad de la enfermedad. Se demostró que los virus influenza A y B en Cuba evolucionaron hacia diferentes variantes genéticas, representadas por los linajes incluidos en las vacunas estacionales. Algunas de las variantes detectadas divergieron genéticamente de los linajes de la vacuna estacional. Durante una de las temporadas se detectó la co-circulación de cepas pertenecientes a los linajes B/Victoria/87 y B/Yamagata/88 de los virus influenza B. Se detectó la circulación de diferentes variantes genéticas del virus influenza A(H1N1)pdm09 con diferentes mutaciones, con el predominio del grupo genético 7 caracterizado por la mutación S203T en el sitio de unión al receptor. La sobre expresión de los niveles de RANTES y TLR-2, y la presencia de la delección CCR5 Δ 32 sugiere su participación en la severidad del cuadro clínico producido por el virus influenza A(H1N1)pdm09. Se evidenció la circulación de variantes de virus influenza A(H3N2) y A(H1N1)pdm09 resistentes a los bloqueadores del canal M2. Las variantes resistentes a los inhibidores de la neuraminidasa emergieron en el virus influenza A(H1N1) estacional a partir del año 2008, después de la ganancia de mutaciones permisivas. También se detectó la mutación S162N en la HA del virus pandémico, sugiriendo la posible multiplicación de estas variantes en presencia de los inhibidores de la neuraminidasa.

	Pág.
I. INTRODUCCIÓN	1
I.1 Antecedentes	1
I.2 Hipótesis de trabajo	3
I.3 Objetivos	4
I.4 Novedad Científica	4
I.5 Valor teórico y práctico	5
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	6
II.1 Los virus influenza. Clasificación y nomenclatura	6
II.2 Organización y estructura del virus	6
II.3 Genoma y proteínas virales	8
II.4 Replicación de los virus influenza	9
II.4.1 Unión al receptor celular	9
II.4.2 Penetración y desnudamiento del virus	11
II.4.3 Síntesis de ARN viral y proteínas virales	11
II.4.4 Empaquetamiento del ARN y ensamblaje del virus	12
II.4.5 Liberación del virus	12
II. 5 Epidemiología de los virus influenza	12
II.5.1 Estacionalidad	13
II.5.2 Deriva antigénica y salto antigénico	14
II.5.3 Historia de las pandemias	15
II.5.3.1 El virus pandémico del año 1918	16
II.5.3.2 El virus pandémico de 1957-58	16
II.5.3.3 El virus pandémico de 1968	17
II.5.3.4 El virus pandémico de 1977-78	17
II.5.3.5 El virus pandémico de 2009-2010	18
II.5.4 Epidemiología molecular	18
II.6 Determinantes de patogenicidad	20
II.6.1 Factores virales	21
II.6.1.1 Proteína hemaglutinina	21
II.6.1.2 Proteína neuraminidasa	22
II.6.1.3 Proteína PB2	23
II.6.1.4 Proteína PB1-F2	23
II.6.1.5 Proteína NS1	24
II.6.2 Factores del hospedero	25
II.6.2.1 Citocinas y quimiocinas proinflamatorias	25
II.6.2.2 Polimorfismo del receptor CCR5	27
II.7 Glicosilaciones en las proteínas de los virus influenza	28

II.8 Drogas antivirales anti-influenza: resistencia	30
II.8.1 Bloqueadores del canal M2	30
II.8.2 Inhibidores de la neuraminidasa	31
III. MATERIALES Y MÉTODOS	33
III.1 Diseño general de la investigación	33
III.2 Determinar la circulación de variantes genéticas de los virus influenza A y B durante el período de estudio	33
III.2.1 Muestra	33
III.2.2 Extracción de ARN	34
III.2.3 TR-RCP anidada para la amplificación de un segmento de la región HA1 de la hemaglutinina de los virus influenza A(H1N1), A(H1N1)pdm09, y A(H3N2)	35
III.2.4 TR-RCP anidada para la amplificación de un segmento de la región HA1 de la hemaglutinina de los virus influenza B	36
III.2.5 Secuenciación nucleotídica de un segmento de la región HA1 de la hemaglutinina de los virus influenza A y B	37
III.2.5.1 Purificación de los productos de RCP	37
III.2.5.2 Secuenciación nucleotídica	37
III.2.5.3 Análisis filogenético	38
III.3 Determinar la relación de los niveles de expresión del ARN de IL-1 β , IL-8, RANTES y el TLR-2 y la presencia del CCR5 Δ 32, con la forma severa de la enfermedad producida por el virus influenza A(H1N1)pdm09 en abril-diciembre/2009	39
III.3.1 Muestra	39
III.3.2 Extracción del ARN	40
III.3.3 Cuantificación relativa de los niveles de expresión del ARN de IL-1 β , IL-8, RANTES y el TLR-2 en los grupos analizados	40
III.3.3.1 TR-RCP en tiempo real semicuantitativa utilizando SYBR Green	41
III.3.4 RCP para la detección de la delección Δ 32 del CCR5	42
III.3.4.1 Extracción del ADN	42
III.3.4.2 RCP para la detección de la delección de 32 pares de bases en el gen ccr5	42
III.3.5 Análisis estadísticos	43
III.4 Identificar la circulación de variantes de los virus influenza resistentes a los bloqueadores del canal M2 y a los inhibidores de la neuraminidasa en el período de estudio	44
III.4.1 Muestra	44
III.4.2 Extracción de ARN	44
III.4.3 TR-RCP punto final para la amplificación de un segmento del gen de la matriz de los virus influenza A	44
III.4.4 TR-RCP anidada punto final para la amplificación de un segmento del gen de la neuraminidasa de los virus influenza A	45
III.4.5 TR-RCP punto final para la amplificación de un segmento del gen de la neuraminidasa de los virus influenza B	46
III.4.6 Secuenciación nucleotídica de un segmento de los genes de las proteínas	47

matriz y neuraminidasa de los virus influenza A y neuraminidasa de los virus influenza B	
III.4.6.1 Purificación de los productos de RCP	47
III.4.6.2 Secuenciación nucleotídica	47
III.4.7 Análisis de marcadores moleculares relacionados con la resistencia a los adamantanos e inhibidores de la neuraminidasa	47
III.5 Consideraciones éticas de la investigación	47
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	49
IV.1 Determinar la circulación de variantes genéticas de los virus influenza A y B durante el período de estudio	49
IV.1.1 Virus influenza A(H3N2) estacional	49
IV.1.2 Virus influenza A(H1N1) estacional	51
IV.1.3 Virus influenza B estacional	54
IV.1.4 Análisis de las relaciones filogenéticas y las secuencias aminoacídicas de un segmento de la región HA1 del gen de la hemaglutinina de los virus influenza A(H1N1)pdm09	57
IV.2 Determinar la relación de los niveles de expresión del ARN de IL-1 β , IL-8, RANTES y el TLR-2 y la presencia del CCR5 Δ 32, con la forma severa de la enfermedad producida por el virus influenza A(H1N1)pdm09 en abril-diciembre/2009	62
IV.2.1 Polimorfismo del gen ccr5 en pacientes infectados con el virus influenza A(H1N1)pdm09	65
IV.3 Identificar la circulación de variantes de los virus influenza resistentes a los bloqueadores del canal M2 y a los inhibidores de la neuraminidasa en el período de estudio	69
IV.3.1 Detección de marcadores moleculares de resistencia a los bloqueadores del canal M2 en los virus influenza A circulantes en Cuba.	69
IV.3.2 Detección de marcadores moleculares de resistencia a los inhibidores de la neuraminidasa en los virus influenza A y B circulantes en Cuba	71
V. DISCUSIÓN INTEGRADA	75
VI. CONCLUSIONES	80
VII. RECOMENDACIONES	81
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	82
ANEXOS	101



Capítulo I
INTRODUCCIÓN

I. INTRODUCCIÓN

I.1 Antecedentes

Los virus influenza, afectan a las poblaciones humanas desde tiempos muy antiguos, y constituyen tres de los cinco géneros ubicados dentro de la familia *Orthomyxoviridae*: influenza A, influenza B e influenza C (1). Aunque estos virus pueden producir el mismo cuadro clínico, difieren en su comportamiento epidemiológico. Los virus influenza C producen casos esporádicos por lo que no son considerados virus estacionales, a diferencia de los virus influenza A y B que producen epidemias con patrones estacionales bien definidos, sobre todo en los países de clima templado (2). Sin embargo, solo los virus influenza A pueden originar pandemias, eventos asociados a elevadas tasas de morbilidad y mortalidad en la población humana (3).

Generalmente, la Influenza transcurre como una enfermedad leve, restringida al TRS y autolimitada. Sin embargo, dependiendo de varios factores se puede desarrollar una neumonía primaria o secundaria, con un desenlace que puede traer consigo un fallo múltiple de órganos, fallo respiratorio y síndrome de distrés respiratorio agudo que pueden llegar a ser fatales (4). Las epidemias estacionales se caracterizan por alcanzar niveles elevados de morbilidad y mortalidad en los individuos que transitan por las edades extremas de la vida. Por un lado, están los niños menores de 5 años de edad sin un contacto previo con el virus, y por otro, están los adultos mayores de 65 años de edad con una función inmunológica deprimida (5, 6). En contraste, sobre el grupo de adultos jóvenes recaen los efectos más devastadores de las pandemias, hecho al que se han dedicado numerosos estudios sin llegar a un consenso con los resultados obtenidos (7). Existen evidencias que proponen la participación de factores virales, del hospedero y ambientales sobre la severidad de la enfermedad causada por los virus influenza (8-10).

Para mitigar el impacto negativo provocado por estos eventos epidemiológicos, la práctica de la vacunación constituye un pilar fundamental. La efectividad de esta medida depende del riguroso proceso de selección de las cepas componentes de la vacuna. Aun así, la constante presión selectiva ejercida por los anticuerpos producidos por el sistema inmunológico sobre los virus influenza, resulta en la ocurrencia de derivas antigénicas, que en conjunto con los saltos antigénicos, origina cepas antigénicamente nuevas. Para contrarrestar este efecto, todos los años se reúne un panel de expertos de la OMS para actualizar el contenido de la vacuna de los hemisferios Norte y Sur (11). Otra de las medidas para mitigar el efecto de las epidemias y las pandemias es el uso de las drogas antivirales, divididas en dos tipos fundamentales: bloqueadores del canal M2 e inhibidores de la neuraminidasa (INAs). Las drogas antivirales constituyen la intervención primaria para el tratamiento y la profilaxis post-exposición a los virus influenza. Sin embargo, la emergencia de la resistencia a los bloqueadores del canal M2 dejó obsoleto el uso de este tipo de droga antiviral, mientras que por otro lado se ha notificado la emergencia de variantes resistentes a los INAs. Este panorama hace más compleja la toma de decisiones para el tratamiento y la profilaxis de esta enfermedad (12).

La vigilancia inter-pandémica tiene un componente de laboratorio importante, y constituye la herramienta principal para el seguimiento de la evolución de los virus influenza, realizar una selección adecuada de las cepas para la vacuna estacional, aplicar una política de tratamiento antiviral adecuada y detectar a tiempo la introducción de variantes pandémicas (13). Un ejemplo reciente fue la identificación de un brote atípico de Infección Respiratoria Aguda (IRA) en México durante el mes de marzo del año 2009. En este escenario se identificó como agente etiológico al virus influenza A(H1N1)pdm09, responsable de la primera pandemia del siglo XXI. En términos de morbi-mortalidad, la pandemia producida por el virus influenza A(H1N1)pdm09 fue calificada de leve a moderada, sin embargo, se detectó un incremento en la notificación de casos fatales que no superaban los 55 años de edad (4). Mientras los primeros análisis del virus demostraban la no existencia de marcadores moleculares asociados a una virulencia elevada (14, 15), otras investigaciones centraron sus esfuerzos en la respuesta inmune del hospedero (16, 17).

En Cuba, la influenza y neumonía (I-N) constituyen la cuarta causa de mortalidad en la población general dentro de todas las causas posibles y la primera entre las enfermedades infecciosas (18).

Por esta razón, el Programa Nacional de Prevención y Control (PNPC) de las IRAs del Ministerio de Salud Pública (MINSAP) prioriza la vacunación anti-influenza anualmente en grupos de riesgo establecidos, y la aplicación de la terapia antiviral. Como parte del PNPC de las IRAs, la vigilancia de laboratorio se encarga de la detección de los virus estacionales y las variantes con potencial pandémico que circulen en el país. Sin embargo, en Cuba no hay precedentes sobre la caracterización genética de los virus influenza, la cual aporta datos de utilidad con vistas a fortalecer el PNPC de las IRAs. Entre los objetivos de la caracterización genética podemos citar: seguir la evolución de las diferentes variantes genéticas en el tiempo, detectar la emergencia de resistencia a las drogas antivirales, detectar marcadores virales o del hospedero asociados a la severidad de la enfermedad y determinar la analogía genética de los virus circulantes con las cepas de la vacuna estacional.

La vigilancia de laboratorio permitió la detección del virus influenza A(H1N1)pdm09 en Cuba durante el mes de abril del año 2009 (19). Durante los meses de abril a diciembre del año 2009, se produjo un incremento del número de casos notificados con IRAG y de fallecidos por el virus influenza A(H1N1)pdm09. Llamativamente, en el grupo de pacientes que no rebasaba los 55 años de edad se produjo con mayor frecuencia una IRAG (67,2%) o un fallecimiento (71.8%), según datos obtenidos del Registro de Datos del LNRI.

En este contexto se desarrolla el presente trabajo, donde se pretende identificar la circulación de variantes genéticas de los virus influenza A y B en Cuba. Además, debido al impacto de la pandemia del año 2009 sobre la población adulta joven, se consideró necesario indagar acerca de posibles factores de la respuesta inmune innata del hospedero relacionados a este comportamiento. Por último, se decidió caracterizar los patrones de resistencia a las drogas antivirales, considerando su aplicación para el desarrollo de las políticas de tratamiento de las epidemias estacionales y de los planes de preparación anti-pandémicos.

I.2 Hipótesis de trabajo

Los virus influenza A y B durante el período 2006-2010 en Cuba evolucionan hacia variantes genéticas diferentes, algunas producen la forma severa de la enfermedad relacionada a factores virales y/o del hospedero, y otras resultan resistentes a las drogas antivirales.

I.3 Objetivos

General:

Proporcionar evidencias de la circulación de variantes genéticas de los virus influenza A y B en Cuba durante el período 2006-2010, y de la relación entre la forma severa de la enfermedad producida por algunas variantes con factores del hospedero.

Específicos:

1. Determinar la circulación de variantes genéticas de los virus influenza A y B durante el período de estudio.
2. Determinar la relación de los niveles de expresión del ARN de IL-1 β , IL-8, RANTES y el TLR-2 y la presencia del CCR5 Δ 32, con la forma severa de la enfermedad producida por el virus influenza A(H1N1)pdm09 en abril-diciembre/2009.
3. Identificar la circulación de variantes de los virus influenza resistentes a los bloqueadores del canal M2 y a los inhibidores de la neuraminidasa en el período de estudio.

I.4 Novedad Científica

- Por primera vez en Cuba se realizó la caracterización molecular del gen de la hemaglutinina de los virus influenza lo que demostró su evolución a diferentes variantes genéticas, algunas de ellas divergentes con las cepas de la vacuna anti-influenza.
- Por primera vez en Cuba se realizó la caracterización molecular de los genes de la matriz y de la neuraminidasa de los virus influenza, lo que permitió detectar la circulación de variantes con los marcadores de resistencia a los bloqueadores del canal M2 o a los inhibidores de la neuraminidasa.
- La caracterización molecular del virus pandémico en Cuba, aportó conocimientos a nivel nacional e internacional sobre la evolución de este agente nuevo en la población humana.
- La relación entre los niveles de expresión elevados de RANTES y el TLR-2 con la severidad de la enfermedad producida por el virus pandémico aportó nuevos conocimientos sobre la inmunopatogenia de la enfermedad, relacionados a la interacción virus-hospedero.

I.5 Valor teórico y práctico

- Los resultados obtenidos a partir de la caracterización de la HA de los virus influenza, contribuyeron a establecer la evolución y la circulación de variantes virales divergentes con las cepas de la vacuna estacional en el período de estudio. Este resultado demostró la necesidad de sistematizar la vigilancia molecular de los virus influenza para detectar la posible emergencia de variantes genéticamente divergentes con las cepas de la vacuna.
- La emergencia de variantes genéticas de virus influenza resistentes a las drogas antivirales, demostró la importancia de este tipo de estudio como parte de la vigilancia estacional. Este resultado aportó criterios de laboratorio útiles para la actualización de las políticas de tratamiento y prevención por parte del MINSAP, y demostró la necesidad de diseñar nuevas drogas antivirales.
- Los resultados obtenidos sobre la relación de los niveles de expresión de algunos determinantes de la respuesta inmune con la severidad de la enfermedad producida por el virus influenza A(H1N1)pdm09, contribuyen al conocimiento de la interacción virus-hospedero en relación a la identificación de posibles dianas terapéuticas para prevenir o disminuir las complicaciones de esta enfermedad.
- Los resultados obtenidos orientan hacia la necesidad de mejorar e incrementar la vigilancia de los virus influenza.
- Los resultados presentados en esta investigación cuentan con reconocimientos entre los que se destacan: Un Logro de la Academia de Ciencias de Cuba, un Resultado Relevante institucional, un Premio en el Fórum Provincial de Ciencia y Técnica, un Premio Anual de la Salud en la categoría de artículo científico, un Premio Anual en la categoría de investigaciones de sistemas y servicios de Salud. Al mismo tiempo, forman parte de seis publicaciones y nueve presentaciones en siete eventos científicos. Estos resultados también han formado parte de dos Tesis de Maestría en Virología y una Tesis de Especialista en Inmunología.



Capítulo II

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

II.1 Los virus influenza. Clasificación y nomenclatura.

Los virus influenza tipo A, B y C, representan tres de los cinco géneros que conforman la familia *Orthomyxoviridae*. Los estudios de secuenciación han demostrado que estos virus comparten un ancestro genético común. Sin embargo, también divergen genéticamente, detectándose el reordenamiento viral (intercambio de segmentos del ARN viral) dentro de cada tipo, no ocurriendo así entre tipos. Los virus influenza A son los más variables, pueden caracterizarse por el subtipo de sus glicoproteínas de superficie, la hemaglutinina (HA) y la neuraminidasa (NA).

La nomenclatura para estos virus es homogénea, e incluye el tipo de virus, la especie a partir de la cual fue aislado (si no es humano), lugar en el que fue aislado, número de aislamiento, año de aislamiento, y el subtipo de HA y NA (solo para los virus influenza A). Existen varios subtipos circulantes de los virus influenza A que son genéticamente diferentes (17 para la HA y 10 para la NA), aunque solo tres subtipos de HA (H1-H3) y dos de NA (N1-2), causan epidemias caracterizadas por una diseminación sostenida y con transmisión persona-persona muy elevada (20-22).

II.2 Organización y estructura del virus.

Los virus influenza A y B son indistinguibles por microscopía electrónica, se observan como partículas esféricas o filamentosas. Los virus influenza A están cubiertos por las glicoproteínas HA y NA en una proporción aproximada de cuatro a uno, proyectándose desde la membrana lipídica derivada de la membrana de la célula hospedera (20). Un número pequeño de canales iónicos conformados por la proteína matriz 2 (M2) atraviesan la envoltura lipídica, con una proporción de un canal M2 por cada 10^1 a 10^2 moléculas de HA (23). La envoltura y sus tres proteínas integrales de membrana (HA, NA y M2), recubren a la proteína

matriz M1, la cual encierra al núcleo del virión (Figura II.1). Por debajo de la M1 se encuentran la proteína de exportación nuclear (NEP o NS2, del inglés, nuclear export protein or nonstructural protein 2) y el complejo de ribonucleoproteína (RNP, del inglés, ribonucleoprotein), está formado por los segmentos del ARN viral cubiertos por la nucleoproteína (NP, del inglés, nucleoprotein) y la polimerasa heterotrimérica ARN polimerasa-ARN dependiente, compuesta por dos subunidades de polimerasa básica (PB1 y PB2, del inglés, polymerase basic) y una de polimerasa ácida (PA, del inglés, polymerase acidic).

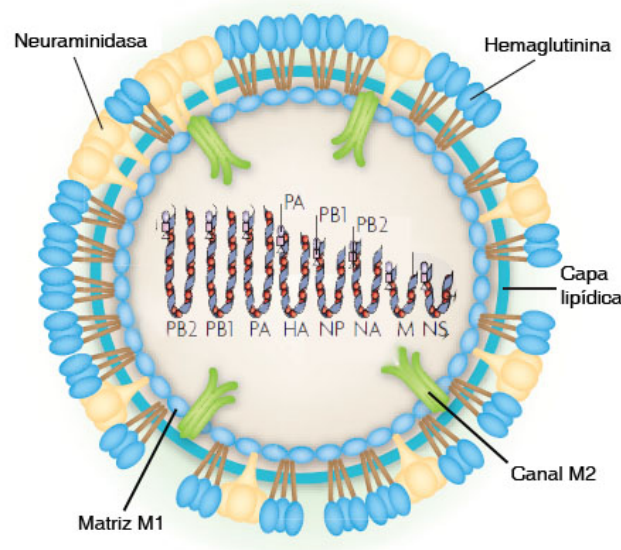


Figura II.1. Esquema de la estructura de los virus influenza. *FUENTE: tomada de Nat Struct Mol Biol. 2009 Mar;16(3):234.*

La organización de los virus influenza B es similar, con 4 proteínas de envoltura: HA, NA, y en lugar de la M2 están la proteína matriz codificada por un marco de lectura alternativo -1 del segmento 6 (NB, del inglés, matrix protein in a -1 alternate reading frame) y la proteína de membrana codificada por un marco de lectura alternativo +2 del segmento 7 (BM2, del inglés, membrane protein in a +2 alternate reading frame). Los virus influenza C son estructuralmente diferentes de los virus influenza A y B. Pueden formar estructuras parecidas a largos cordones (en el orden de los 500µm) sobre la superficie de las células infectadas. Sin embargo, desde el punto de vista de su composición, los virus influenza C son similares, con una envoltura lipídica cubierta por glicoproteínas que reviste a la proteína matriz y al complejo RNP. Los virus

influenza C solo tienen una glicoproteína de superficie llamada proteína de fusión hemaglutinina-esterasa (HEF, del inglés, hemagglutinin-esterase-fusion), la cual se corresponde funcionalmente a la HA y la NA de los virus influenza A y B, y una proteína menor de envoltura (CM2, del inglés, minor envelope protein) (20).

II.3 Genoma y proteínas virales.

El genoma de los virus influenza A y B está compuesto por ocho segmentos de ARN, el de los virus influenza C solo incluye siete segmentos. La tabla II.1 muestra las proteínas producidas a partir de cada uno de los segmentos y sus funciones.

Tabla II.1. Segmentos genómicos de los virus influenza A y proteínas que codifican.

Segmento	Proteína (s)	Longitud (aminoácidos)	Función de la proteína
1	PB2	759	Subunidad polimerasa: reconocimiento de la caperuza del ARNm
2	PB1	757	Subunidad polimerasa: alargamiento del ARN, actividad endonucleasa
	PB1-F2	87	Actividad pro-apoptótica
3	PA	716	Subunidad de la polimerasa: actividad proteasa
4	HA	550	Glicoproteína de superficie: antígeno principal, unión a receptor y actividad de fusión
5	NP	498	Proteína de unión al ARN: regulación de la importación nuclear
6	NA	454	Glicoproteína de superficie: actividad sialidasa, liberación del virus
7	M1	252	Proteína matriz: interacción con la RNP viral, regulación de la exportación nuclear, gemación viral
	M2	97	Canal iónico: desnudamiento viral y ensamblaje
8	NS1	230	Proteína antagonista del interferón: regulación de la expresión génica del hospedero
	NEP/NS2	121	Exportación nuclear del ARN

Los ocho segmentos del genoma de los virus influenza A y B (y los siete segmentos de los virus influenza C) se enumeran en orden decreciente respecto a sus longitudes. En los virus influenza A y B los segmentos 1, 3, 4 y 5 codifican para una sola proteína (PB2, PA, HA y NP, respectivamente). El segmento 2 de todos los virus influenza codifica para la subunidad de la polimerasa PB1. En algunas cepas de los virus influenza A, este segmento codifica también para la pequeña proteína accesoria PB1-F2 con actividad pro-apoptotica, mediante un marco de lectura

alternativo +1. En los virus influenza B y C no se han encontrado proteínas análogas a la PB1-F2 (24).

Por otro lado, el segmento 6 de los virus influenza A codifica solo para la proteína NA. En los virus influenza B codifica para la proteína NA, y mediante un marco de lectura alternativo -1 para la proteína matriz NB, la cual es una proteína integral de membrana equivalente a la M2 de los virus influenza A (25).

El segmento 7 de los virus influenza A y B codifica para la proteína matriz M1. Este segmento también codifica para el canal iónico M2 de los virus influenza A, mediante un mecanismo de empalme de ARN (26). Para los virus influenza B, codifica la proteína de membrana BM2 en un marco de lectura alternativo +2 (27, 28).

El segmento 8 de los virus influenza A y B expresa la proteína NS1 (29-31) que es antagonista del interferón (IFN), y mediante un mecanismo de empalme de ARN codifica para la proteína NEP. Esta última, está involucrada en la exportación del ARN desde el núcleo de la célula hospedera. La organización del genoma de los virus influenza C es similar a la de los virus influenza A y B de forma general, aunque su proteína HEF reemplaza a las proteínas HA y NA (32, 33).

II.4 Replicación de los virus influenza.

II.4.1 Unión al receptor celular.

Los virus influenza se unen al ácido N-acetilneuramínico (siálico) que está presente sobre la superficie de la célula hospedera, para iniciar su replicación (Figura II.2). El ácido siálico (AS) se encuentra en diferentes tipos celulares y especies animales. El carbono-2 (C-2) del extremo terminal del AS puede enlazarse con el carbono-3 (C-3) o con el carbono-6 (C-6) de la galactosa, formando puentes de unión α 2,3-AS o α 2,6-AS, lo que origina configuraciones estéricas únicas del ácido siálico terminal. La HA que está en la superficie de los virus influenza se une al ácido siálico, en función de su especificidad preferencial por los enlaces α 2,3-AS o α 2,6-AS. Los enlaces α 2,6-AS predominan en las células epiteliales de la tráquea de los humanos, mientras que

los enlaces $\alpha 2,3$ -AS son más comunes en el epitelio intestinal de los patos. Sin embargo, el ácido siálico con enlace terminal $\alpha 2,3$ -AS, también está presente en el epitelio del tracto respiratorio (TR) de los humanos, aunque en proporciones menores que las uniones terminales $\alpha 2,6$ -AS (34, 35). Consecuentemente, los humanos y otros primates pueden infectarse con los virus influenza aviar, aunque con una eficiencia más baja que la de las cepas que circulan en el humano (36).

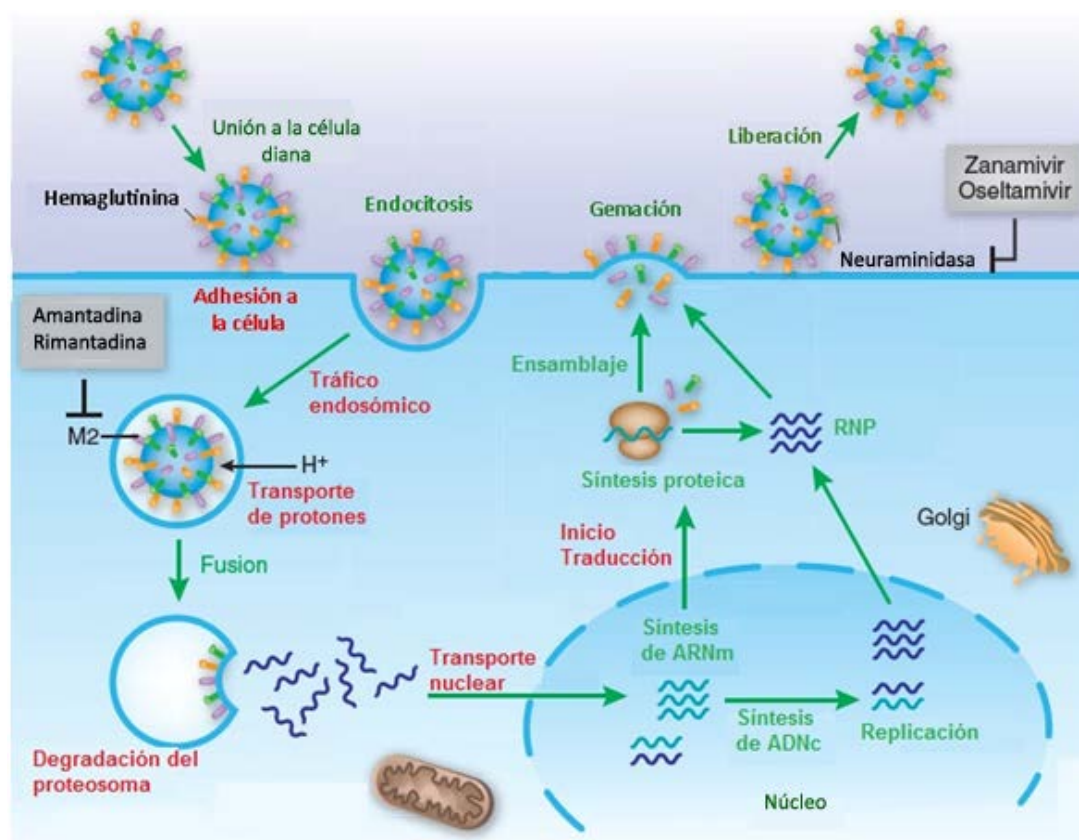


Figura II.2. Esquema del ciclo replicativo de los virus influenza. *FUENTE: tomada de Nat Biotechnol. 2010 Mar;28(3):239.*

Durante la replicación viral las serino-proteasas escinden la HA en las subunidades HA1 y HA2, modificación post-traduccion necesaria para la infectividad del virus. La subunidad HA2 media la fusión de la envoltura viral con la membrana celular, mientras que la subunidad HA1 presenta los sitios de unión al receptor y los sitios antigénicos (37).

II.4.2 Penetración y desnudamiento del virus.

Después que la proteína HA (HEF para los virus influenza C) se enlaza con el ácido siálico, el virus es endocitado (Figura II.2). El pH bajo activa un cambio conformacional en la proteína HA, se expone el péptido de fusión y se une la envoltura viral con la membrana endosomal, y se abre un poro a través del cual se liberan las RNPs al citoplasma de la célula hospedera (38).

Los iones hidrógeno del endosoma penetran al interior de la partícula viral a través del canal iónico M2. Esta proteína constituye la diana de la amantadina, lo que impide el desnudamiento del virus mediante el bloqueo de la actividad del canal (39-41). La acidificación del interior de la partícula de los virus influenza interrumpe las interacciones internas proteína-proteína, lo que permite la liberación de las RNPs virales desde la matriz viral hacia el citoplasma celular (42).

II.4.3 Síntesis de ARN viral y proteínas virales.

Las RNPs se transportan hacia el núcleo de la célula hospedera a través de señales de localización nuclear para proteínas virales (NLSs, del inglés, nuclear localization signals) (43). El proceso de síntesis de todos los ARN de los virus influenza ocurre en el núcleo de la célula. La ARN polimerasa-ARN dependiente del virus, utiliza los ARNv de sentido negativo como moldes para sintetizar dos especies de ARN de sentido positivo: ARNm moldes para la síntesis de proteínas virales y ARN complementario (ARNc) intermediario, a partir de los cuales la ARN polimerasa transcribe más copias de ARNv genómico de sentido negativo. El ARNm poliadenilado y con caperuza se exporta para su traducción en el citoplasma. La proteína M1 interactúa con el ARNv y la NP y los transporta hacia el citoplasma de la célula. La exportación de M1-RNP hacia el citoplasma a través de los poros nucleares, ocurre cuando M1 se asocia con la NEP (43).

A continuación, las proteínas HA, NA y M2 se sintetizan a partir del ARNm de origen viral en los ribosomas asociados a las membranas del retículo endoplasmático, donde se pliegan y transportan hacia el aparato de Golgi para las modificaciones post-traduccionales. Las tres proteínas tienen señales de tipo apical lo que hace que posteriormente se dirijan hacia la membrana de la célula para el ensamblaje de la partícula viral. Aunque se conoce muy poco acerca de la traducción y disposición de las proteínas que no son de la envoltura viral, se piensa

que la M1 interviene estableciendo el contacto del complejo RNP-NEP con las proteínas de la envoltura HA, NA y M2, para el empaquetamiento en la membrana de la célula hospedera (44).

II.4.4 Empaquetamiento del ARN y ensamblaje del virus.

Anteriormente se consideraba que el empaquetamiento del ARNv era un proceso totalmente arbitrario. Sin embargo, existen evidencias que sugieren que el empaquetamiento es un proceso más selectivo, en el que hay señales discretas de empaquetamiento en los segmentos de ARNv que aseguran que se incorpore un juego de genoma completo a la mayoría de las partículas virales nuevas (45, 46).

II.4.5 Liberación del virus.

La gemación del virus ocurre a través de la membrana celular y se inicia por la acumulación de la proteína M1 en la cara citoplasmática de la bicapa lipídica. Las espículas de HA unen las partículas virales nacientes a los residuos de ácido siálico en la superficie de la célula hasta que se liberan por la actividad sialidasa de la proteína viral NA. Esta proteína viral también elimina los residuos de ácido siálico de la envoltura del virus, evitando la agregación de las partículas virales (47). También se piensa que la NA favorece a la infectividad del virus mediante la ruptura de las mucinas en las secreciones del TR, lo que permite al virus su penetración a través del epitelio respiratorio (48).

II. 5 Epidemiología de los virus influenza.

Los virus influenza causan infecciones zoonóticas y se adaptan a los humanos, contribuyendo a la transmisión sostenida y a la emergencia de virus nuevos. Los mecanismos a través de los cuales los virus evolucionan en un hospedero, causan infecciones zoonóticas y se adaptan a especies nuevas, permanecen sin ser esclarecidos (49).

El impacto de la Influenza pandémica y estacional, se evaluó con los registros públicos disponibles. Así comenzó a reconocerse que ciertos grupos poblacionales presentan un riesgo mayor de padecer complicaciones durante la infección con los virus influenza. En ese tiempo, se desarrollaron métodos que se utilizan en la actualidad, como el uso de la mortalidad causada por

la Influenza y neumonía (I-N) para medir su efecto sobre los brotes y las muertes. Esto permitió esclarecer el efecto de la pandemia del año 1918 sobre la mortalidad, debido a que en aquellos momentos no fue posible aislar o identificar a los virus influenza (50, 51). Los datos obtenidos demostraron que durante la pandemia del año 1918, se produjo un elevado número de fallecidos en adultos jóvenes, a diferencia de los patrones descritos para la Influenza estacional. Las características inusuales de la pandemia del año 1918, se confirmaron al ver que los patrones de mortalidad de las pandemias de 1957 y 1968 se asemejaron más al patrón de la Influenza estacional, con un número de casos fatales mayor en las edades extremas de la vida y en los grupos de riesgo (6, 52).

II.5.1 Estacionalidad.

El cómo y por qué la estacionalidad de los virus influenza varía con las latitudes permanecen desconocidos (53). Los brotes localizados de Influenza estacional ocurren también durante los años inter-pandémicos, de forma particular cuando las cepas del virus irrumpen en las comunidades donde la población tiene una inmunidad preexistente baja o nula frente al virus circulante. Sin embargo, las causas de la estacionalidad no se han esclarecido aún.

En los climas templados, la circulación de los virus influenza a cualquier nivel de intensidad se caracteriza por la estacionalidad. En estas regiones, la enfermedad está presente en niveles bajos durante todo el año, con un incremento estacional típico durante los meses de invierno (54). El hecho de que en estas regiones los virus influenza sigan un patrón estacional, hace posible la estimación del impacto de la Influenza sin la identificación del total de personas infectadas utilizando técnicas de laboratorio (55). A pesar de estos conocimientos, es necesario señalar que a veces no es posible detectar el máximo de la transmisión viral.

En las regiones donde no existe una temporada invernal definida, los patrones de transmisión son diferentes. En estas regiones, por lo general coinciden el momento de circulación máxima de los virus con la época de lluvias (56). En los países tropicales, se detectan casos esporádicos de infección por los virus influenza durante todo el año y se incrementan en los períodos lluviosos, aunque no se ha encontrado una asociación de forma convincente con las condiciones ambientales (49, 57, 58). Sin embargo, esta observación no está en concordancia con algunos

estudios experimentales realizados en animales, donde se demostró que la transmisión está favorecida en ambientes secos (59). Es posible que otros factores, además de los climáticos, estén involucrados en la transmisión (vacaciones escolares, hacinamiento, reuniones públicas). Este comportamiento de la estacionalidad de la Influenza en los trópicos, dificulta conocer el verdadero impacto de la enfermedad (60). De hecho, hasta el momento en que se iniciaron los estudios virológicos en estas regiones, se asumió que la Influenza era una enfermedad de los climas más fríos, aunque las evidencias apuntaron lo contrario. Estos estudios permitieron apoyar con evidencias virológicas que el impacto de la Influenza es tan elevado como en las regiones templadas, aunque con una ocurrencia más difundida a lo largo del año. Estas conclusiones tienen implicaciones obvias en términos del uso de vacunas en partes muy pobladas del mundo, donde la inmunización no fue tan utilizada hasta el presente (56, 60).

II.5.2 Deriva antigénica y salto antigénico.

Los virus influenza A y B son evolutivamente dinámicos, aunque la tasa de mutaciones de los virus influenza A es mayor (4×10^{-3} sustituciones nucleotídicas por sitio por año) que la de los virus influenza B (2×10^{-3} sustituciones nucleotídicas por sitio por año) (61). En estos virus se producen mutaciones que originan cambios de aminoácidos en las regiones antigénicas de las glicoproteínas de superficie HA y NA y ofrecen ventajas selectivas a las cepas virales a través de la evasión de la inmunidad preexistente. A estas mutaciones se les denominó como “deriva antigénica” y ocurren tanto en los virus influenza A como influenza B (3).

La coinfección de una célula del hospedero con virus diferentes puede originar una progenie viral cuyo genoma va estar formado por segmentos de los virus parentales. Cuando en este proceso se introduce un subtipo nuevo de HA y/o NA en la población humana se denomina “salto antigénico”. El salto antigénico también ocurre a través de la transmisión directa de un subtipo nuevo de los virus influenza desde un reservorio animal al humano. Los subtipos nuevos son inmunológicamente diferentes a las cepas que circularon previamente, produciendo tasas de infección muy elevadas en una población inmunológicamente virgen y originando pandemias (3).

II.5.3 Historia de las pandemias.

El origen de una cepa de virus pandémico, se produce cuando un virus aviar se reordena con un virus humano durante la co-infección en un mamífero infectado, o cuando un virus animal se logra transmitir de una forma eficiente entre humanos y es capaz de producir la enfermedad (62). Para lograr un entendimiento completo de las pandemias es necesario contar con el aislamiento del virus que las origina, hecho que no ocurrió hasta el año 1957. El virus pandémico del año 1918 fue reconstruido utilizando una aproximación “arqueo-viroológica”, sin embargo, los subtipos o la composición genética de los virus pandémicos antes de ese año permanecen desconocidos (63). Todos los virus pandémicos desde el año 1918 contienen segmentos de genes derivados del virus de ese año (Figura II.3) (64).

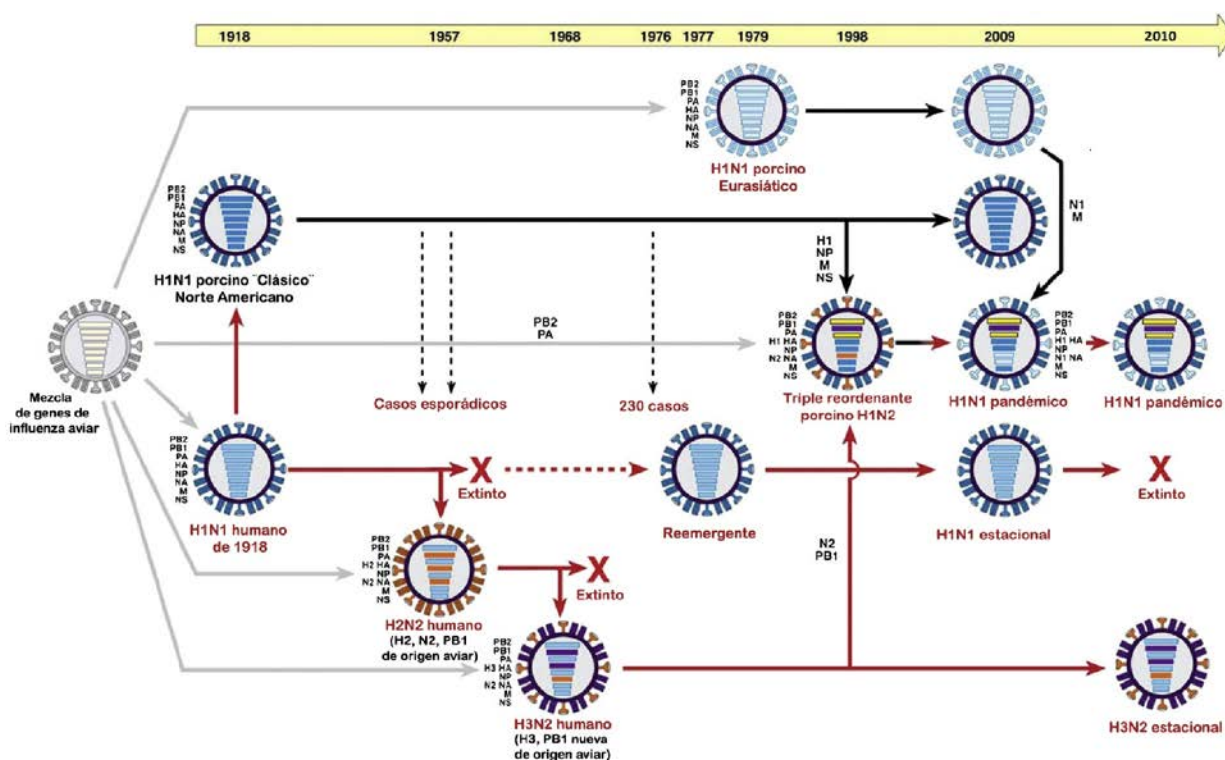


Figura II.3. Relaciones genéticas entre los virus influenza humanos y porcinos relevantes, 1918-2009. Líneas grises: fuente de uno o más segmentos genéticos a partir de la mezcla de genes de los virus influenza aviar. Flechas rojas discontinuas: periodo sin circulación de H1N1 en humanos. Flechas rojas sólidas: rutas evolutivas de los linajes humanos de los virus influenza A. Flechas negras sólidas: rutas evolutivas de los linajes aviares de los virus influenza A. Flecha de negra a roja: origen de H1N1pdm09. Flechas negras discontinuas: infecciones en el humano con los virus influenza A de origen porcino. *FUENTE: tomada de Cell Host & Microbe 7, June 17, 2010; modificada: extendida hasta el año 2010.*

II.5.3.1 El virus pandémico del año 1918.

De todas las pandemias documentadas en la historia, la Influenza “Española” fue la más devastadora, con un estimado de más de 50 millones de personas fallecidas (65). La reconstrucción del genoma viral obtenido a partir de los tejidos de numerosas víctimas demostró que el agente causal fue un virus influenza A(H1N1) de origen aviar (66, 67). Las características epidemiológicas de esta pandemia no tienen precedentes. Se observó la aparición de tres olas pandémicas en el primer año, con una curva de mortalidad en función de la edad con forma de “W” con un máximo inexplicado en el grupo de adultos jóvenes saludables (68).

Alrededor del año 1920 el virus comenzó a circular con un patrón de intermitencias estacionales, hasta que experimentó una deriva antigénica 40 años después. Cuando surgió la pandemia del año 1957, el virus influenza A(H1N1) desapareció de la circulación. Sin embargo, en el año 1977, se reincorporó a la circulación y causó una pandemia de impacto leve que afectó principalmente a los menores de 20 años de edad (64).

A partir de ese momento, se mantuvo co-circulando globalmente junto al virus influenza A(H3N2) descendiente de la pandemia del año 1968. Sin embargo, en el año 2010 el linaje del año 1918 fue desplazado de la circulación por el virus pandémico influenza A(H1N1)pdm09 que continuó co-circulando con el virus influenza A(H3N2) (64). Es importante resaltar que los descendientes del linaje del virus influenza A(H1N1) del año 1918 se han mantenido circulando tanto en humanos como en animales desde ese entonces, y en los últimos 50 años, el virus original y su progenie han sido donantes de genes a los nuevos virus causantes de pandemias, epidemias y epizootias (Figura II.3). De hecho, el virus influenza A(H1N1)pdm09 asociado a la recién concluida pandemia, se considera como la cuarta generación descendiente de ese linaje (64).

II.5.3.2 El virus pandémico de 1957-58.

El virus pandémico influenza A(H2N2) “Asiático” que emergió en el año 1957 fue un descendiente lineal del virus pandémico del año 1918. Este virus adquirió tres segmentos de genes nuevos (H2, N2 y PB1) a través del reordenamiento con un virus aviar desconocido (figura

II.3) (69, 70). Durante la pandemia murieron más de un millón de personas en todo el mundo. Aunque esta pandemia ocurrió en una época en la que la virología experimental de la Influenza era una realidad, la identidad del hospedero en el cual ocurrieron el o los eventos de reordenamiento permanece sin identificar. Aunque desde el punto de vista clínico y anatómopatológico el comportamiento fue similar a la pandemia del año 1918, no se manifestaron las características epidemiológicas inusuales de esta última (forma de “W” de la curva mortalidad). De forma similar a lo ocurrido con virus del año 1918, se convirtió en un virus estacionalmente endémico y esporádico durante un período de 11 años, después del cual desapareció de la circulación (71).

II.5.3.3 El virus pandémico de 1968.

Al igual que las pandemias que le precedieron, el virus influenza A(H3N2) de “Hong Kong” responsable de la pandemia del año 1968, se originó por un evento de reordenamiento entre el virus influenza A(H2N2) circulante en los humanos y un virus influenza A de origen aviar. Este virus influenza A(H3N2) adquirió una nueva HA (subtipo H3) y el segmento del gen PB1 (Figura II.3) (69, 70). El segmento de la NA proviene del virus influenza A(H2N2) del año 1957, mientras que el linaje influenza A(H1N1) del año 1918 aportó cinco segmentos: PB2, PA, NP, M y NS. La pandemia del año 1968 fue más leve en cuanto a su impacto en la mortalidad ya que aproximadamente fallecieron medio millón de personas en todo el mundo. En algunas comunidades se registraron menos muertes que se produjeron en períodos interpandémicos (64). Se ha sugerido que este comportamiento se debió a que el virus pandémico influenza A(H3N2) del año 1968, conservó la N2 que circuló previamente, lo que redujo la duración y severidad de la enfermedad (72). El virus se convirtió rápidamente en endémico y estacional y circuló globalmente durante los últimos 42 años, ocasionando elevadas tasas de morbilidad y mortalidad (64).

II.5.3.4 El virus pandémico de 1977-78.

La pandemia del año 1977, se originó por la re-emergencia de un “descendiente” del virus influenza A(H1N1) del año 1918 (Figura II.3). Sin embargo, se refiere con frecuencia como una pandemia “técnica” que representa un epílogo de la pandemia del año 1918. Es poco probable

que los virus influenza A circulen en los humanos durante más de 20 años sin la acumulación de mutaciones, lo que sugirió que la epidemia del año 1977 fue el resultado de la liberación de una cepa congelada de los años 1950. Los análisis de genética molecular confirmaron que la cepa del año 1977 era muy similar en sus ocho segmentos a las cepas del virus influenza A(H1N1) de inicios de la década del 50. (73).

II.5.3.5 El virus pandémico de 2009-2010.

La pandemia el año 2009 fue ocasionada por un nuevo virus influenza A(H1N1) que se originó a partir de dos virus porcinos no relacionados (14): el porcino “clásico” derivado del virus humano del año 1918 y el linaje aviar Europeo influenza A(H1N1) (Figura II.3) (74). El virus, denominado influenza A(H1N1)pdm09, obtuvo sus segmentos de los genes NA y M del linaje aviar Europeo de influenza A(H1N1) y los seis genes restantes (PB2, PB1, PA, HA, NP y NS) del linaje porcino Norteamericano influenza A(H1N2) triple reordenante. Los segmentos de los genes HA, NP y NS de este linaje provienen del linaje porcino clásico influenza A(H1N1) (originado a partir del H1N1 de 1918). PB2 y PA provienen de un virus aviar tipo A, mientras PB1 procede de un virus influenza A(H3N2) estacional de origen humano y lo obtuvo a partir del linaje porcino influenza A(H3N2) triple reordenante surgido a finales de la década del 90 (15). Se desconoce cuándo y dónde se originó el virus influenza A(H1N1)pdm09, así como la o las especies en las cuales tuvo lugar el reordenamiento, aunque la evolución en los cerdos es una hipótesis muy favorecida. Los análisis de los ancestros comunes más recientes (TMRCA, del inglés, time to most recent common ancestor), han sugerido que el virus pandémico estuvo circulando en los humanos al menos varios meses antes de su detección a inicios del año 2009 (15).

II.5.4 Epidemiología molecular.

En la actualidad, existen 16 subtipos de HA y 9 de NA de los virus influenza A circulando en las aves, y dos de HA y NA en los humanos: H1N1 y H3N2. Recientemente se descubrió el subtipo H17N10 en murciélagos (21, 22). De forma general, los subtipos de HA se clasifican dentro de dos grupos o linajes según sus propiedades antigénicas y sus características estructurales principales. En el Grupo 1, que comprende los subgrupos H1a, H1b y H9, se encuentran el

subtipo H1 que conforma las cepas pandémicas de los años 1918 y 2009 y las cepas estacionales de H1, además contiene al subtipo H5 que incluye las cepas aviarias de influenza A(H5N1) altamente patogénica (H5N1-IAAP). El Grupo 2 comprende los subgrupos H3 y H7, y en ellos se concentran las cepas humanas de H3N2 y las cepas aviarias de H7N7 altamente patogénicas (H7N7-IAAP) respectivamente (75, 76).

Los análisis de diversidad y distribución filogenética de los virus influenza A más utilizados, están basados en características como regiones, períodos, hospederos y linajes virales. Sin embargo, no existen estudios detallados dentro de los tipos o subtipos, excepto para los subtipos H5 y N1. La mayoría de los subtipos de las HA y las NA han evolucionado produciendo variantes genéticas que definen linajes y sublinajes diferentes, sin embargo, se desconoce cuántos existen. De forma arbitraria algunos autores designaron los linajes y sublinajes de acuerdo a su propia apreciación, donde cada denominación se realizó en función de los estudios de evolución, ecología y epidemiología de los virus influenza y no con el objetivo principal de clasificar. Estas nomenclaturas han sido calificadas como ambiguas, misceláneas, autolimitadas y algunas veces hasta confusas (77).

En el caso de los virus influenza B, desde inicios de la década de 1980 se dividieron en dos linajes genética y antigénicamente diferentes: B/Victoria/87 y B/Yamagata/88. El primero predominó durante la década de los años 80, y el segundo predominó con una distribución geográfica amplia durante la década de los años 90. Desde el año 2000, ambos linajes co-circulan en todo el mundo en proporciones variadas y en países, regiones y momentos diferentes. Como resultado de la co-circulación, se produjo la emergencia y diseminación mundial de una variante reordenante, con la HA del linaje B/Victoria/87 y la NA del linaje B/Yamagata/88. Todo este panorama dificulta la predicción de su prevalencia futura y las recomendaciones para la composición de la vacuna (78).

Aunque aún no existe un acuerdo en este tema, los autores realizan con una frecuencia mayor los análisis de filogenia de los virus influenza estableciendo las cepas incluidas en las vacunas estacionales como linajes o cepas de referencia. Actualmente este tipo de estudio es muy

difundido y se emplea para detectar analogías y divergencias entre los virus circulantes y los que componen las vacunas estacionales (79-83).

II.6 Determinantes de patogenicidad.

La patogenicidad de los virus influenza se considera como un evento multigénico, determinada por una combinación de genes en una cepa del virus en un hospedero específico (Figura II.4).

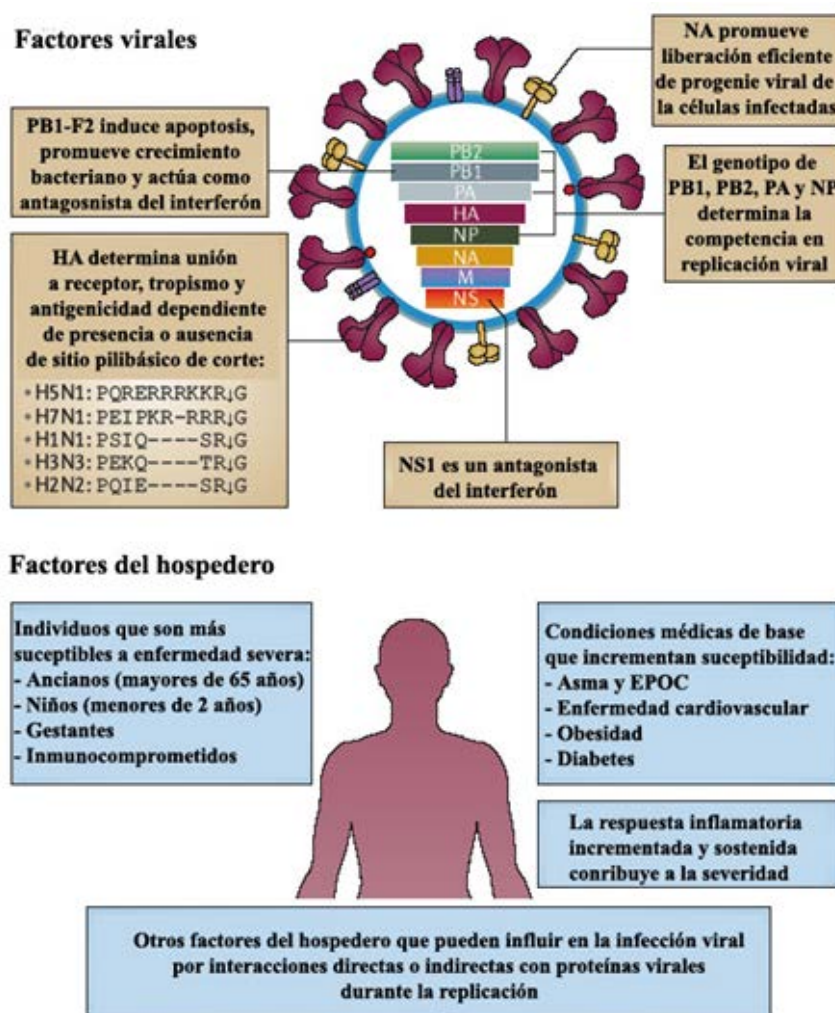


Figura II.4. Factores virales y del hospedero que influyen en la patogenicidad de los virus influenza A. *FUENTE: tomado de Nat Rev Microbiol. 2011;9:598.*

Sin embargo, existen mutaciones genéticas que potencian varias etapas del ciclo de vida viral, entre las que se incluyen: la unión al receptor celular y penetración, la transcripción y traducción del genoma, el ensamblaje y liberación de la partícula viral, y la evasión de la respuesta inmune innata. Estos determinantes de virulencia pueden contribuir al fenotipo altamente patogénico (AP) en los hospederos que infecta (84, 85). Existen otros factores propios del hospedero que pueden afectar de forma determinante el desenlace final de la infección por los virus influenza (5, 86-88). Algunos de estos factores son mostrados en la figura II.4.

II.6.1 Factores virales.

II.6.1.1 Proteína hemaglutinina.

El determinante principal de la severidad en la enfermedad producida por los virus influenza, lo constituye la secuencia de aminoácidos en la que se produce el corte de la HA para hacer infectiva a la partícula viral. Este sitio contiene arginina (R) como único aminoácido en las cepas de los virus influenza de baja patogenicidad, es reconocido por proteasas extracelulares-tipo tripsina que solo están presentes en la superficie del tracto gastrointestinal y respiratorio del hospedero. Sin embargo, el sitio de corte de la HA de los virus IAAP se caracteriza por ser polibásico. Esto favorece su reconocimiento por proteasas celulares presentes en varios órganos. De esta forma se produce la infección viral sistémica debido al incremento de la virulencia, especialmente en aves y mamíferos pequeños (89). Sin embargo, aunque el virus influenza A(H1N1) de la pandemia del año 1918 no tenía este sitio de corte polibásico, su inoculación experimental en animales indujo la forma severa de la enfermedad asociada a niveles elevados de replicación viral y citocinas pro-inflamatorias (90).

Otro aspecto a tener en cuenta en el potencial patogénico que induce la HA de los virus influenza, es su función de unión a los receptores celulares y su participación en la fusión de las membranas viral y endosómica. La adaptación de los virus aviares para reconocer los receptores tipo humanos ($\alpha 2,6$ -AS), se considera un requerimiento para la transmisión eficiente entre los humanos y para el desarrollo de un virus pandémico (91). Los residuos específicos dentro de la HA que controlan la especificidad por una configuración determinada del receptor en los virus influenza humanos y aviares son conocidos, diferenciándose entre los subtipos. La hemaglutinina

del subtipo H1 con propiedades de unión a los receptores tipo humano ($\alpha 2,6$ -AS) contiene aspártico-190 (D190) y 225 (D225), mientras que la hemaglutinina del subtipo H1 aviar contiene glutámico-190 (E190) y glicina-225 (G225). En la hemaglutinina de los subtipos H2 y H3 de los virus humanos este sitio está marcado por leucina-226 (L226) y serina-228 (S228), mientras que en los virus aviares por glutamina-226 (Q226) y G228 (92).

La afinidad de la HA por una configuración determinada del receptor también afecta la transmisión mediante el control del sitio anatómico de replicación viral. Tanto los receptores $\alpha 2,6$ -AS como los $\alpha 2,3$ -AS pueden encontrarse en el tracto respiratorio humano. Sin embargo, sus localizaciones son diferentes, la configuración $\alpha 2,6$ -AS se expresa de forma dominante en el tracto respiratorio superior (TRS), mientras que la configuración $\alpha 2,3$ -AS predomina en el tracto respiratorio inferior (TRI). Es muy probable que la replicación del virus en el TRS sea un requisito para una transmisión eficiente y para el inicio de una infección productiva en el humano (93).

II.6.1.2 Proteína neuraminidasa.

Para lograr una replicación óptima de los virus influenza se requiere de un balance funcional entre la afinidad de unión de la HA al ácido siálico y la actividad enzimática destructora de receptores de la NA (94). Este balance puede verse afectado por un número de eventos tales como: el reordenamiento, la introducción en un nuevo hospedero y la terapia antiviral. Los primeros aislamientos del virus influenza A(H2N2) a partir de humanos durante la pandemia del año 1957, demostraron la presencia de la combinación de una NA (con afinidad por los sustratos con unión $\alpha 2,3$ -AS) y una HA con preferencia por los receptores $\alpha 2,6$ -AS. Con los años, esta N2 adquirió la habilidad de escindir tanto las uniones $\alpha 2,3$ -AS como $\alpha 2,6$ -AS, adaptándose a satisfacer la especificidad de receptor de la HA. Esto probablemente brindó una ventaja selectiva que favoreció la liberación eficiente de la superficie celular (95).

Las drogas antivirales también pueden influir en la adaptación de los virus influenza. El oseltamivir se une al sitio activo de la NA presente en la superficie de la célula infectada, con lo que impide la eliminación de los residuos de ácido siálico lo que provoca la agregación de virus (96).

II.6.1.3 Proteína PB2.

La proteína PB2 de los virus influenza contribuye a la patogenicidad probablemente controlando de forma directa los niveles de replicación del ARNv. Se conoce que el rango de hospedero y la virulencia se afectan por varias sustituciones en la subunidad PB2. En la posición 627 de la subunidad PB2, los virus aviares generalmente presentan glutámico, mientras que casi todos los virus humanos presentan lisina (K). Cuando el virus aviar influenza A(H5N1) presenta la mutación E627K produce una infección sistémica letal en los ratones, sin embargo, esta patogenicidad desaparece para los mamíferos si el residuo permanece siendo glutámico (97). El mecanismo no está bien dilucidado, pero esta mutación afecta la sensibilidad de la temperatura a la que ocurre la replicación del ARNv. Esta mutación también puede afectar la transmisión de los virus influenza: el cambio K627E reduce la transmisión de los virus humanos en los cobayos, posiblemente debido a la reducción en la habilidad de replicarse en el TRS (98).

Otra mutación en la proteína PB2 que se asoció a un incremento en la virulencia de los virus influenza en los mamíferos, fue la sustitución de D por asparagina (N) en la posición 701 (D701N). Este cambio incrementó las tasas de replicación y posibilitó la localización nuclear de PB2 en las células humanas pero no en las aviares, probablemente facilitando la interacción de PB2 con la importina- α (99). Otro aspecto interesante sobre esta proteína se encontró en el virus influenza A(H1N1)pdm09, y es que el nuevo virus no tuvo ninguno de los dos cambios discutidos anteriormente asociados a una patogenicidad elevada, aunque si fueron encontradas otras mutaciones en sitios compensatorios (S590 y R591) (100).

II.6.1.4 Proteína PB1-F2.

Se ha planteado que la proteína PB1-F2 puede tener una participación importante en la virulencia durante la infección por los virus influenza y promoviendo infecciones bacterianas secundarias (101). Esta proteína también tiene función pro-apoptotica en las células del sistema inmune, probablemente como resultado de su asociación con las membranas mitocondriales (24, 101). En los estudios realizados *in vitro*, PB1-F2 promueve la actividad de la polimerasa mediante su unión con la subunidad PB1 de la misma. Sin embargo, el mecanismo que relaciona estas

funciones moleculares con la patogenicidad de los virus influenza, se encuentra en debate hasta nuestros días (102).

Está demostrado que la proteína PB1-F2 contribuyó a la patogenicidad de las cepas pandémicas de los años 1918, 1957 y 1968, así como también para el virus IAAP H5N1 (103-105). La incorporación de la mutación S66N en la proteína PB1-F2 de los virus IAAP H5N1 y el pandémico del año 1918, resultó en la atenuación de esos virus en ratones. Además, los virus con la mutación N66S produjeron un incremento en los títulos virales, en la producción de citocinas y en la forma severa de la enfermedad en ratones (103). En el caso del virus influenza A(H1N1)pdm09 solo expresó una proteína PB1-F2 truncada de 11 aminoácidos, y aún con la introducción de la proteína con las variantes N66 o S66 en un recombinante, no se favoreció la virulencia ni la predisposición a infecciones bacterianas secundarias en ratones o hurones (105).

Por otro lado, la mayoría de los virus influenza aviar expresan esta proteína, sin embargo, una vez introducidos en humanos o en los cerdos tiende a ser truncada. Esto sugiere que la proteína no truncada pudiera brindar alguna ventaja selectiva a los virus aviares, la cual se pierde durante la adaptación a los mamíferos. Por último, se pudiera concluir que la proteína PB1-F2 solo contribuye a la virulencia de cepas pandémicas recién derivadas de los reservorios aviares. Su habilidad de promover virulencia y patogenicidad es específica de cada cepa y hospedero, y está influenciada por otros factores del genoma viral (106).

II.6.1.5 Proteína NS1.

La proteína NS1 es un antagonista del interferón (IFN) (107). En los hospederos infectados por el virus IAAP H5N1, está asociada con la inducción de niveles elevados de citocinas pro-inflamatorias. Aunque esta desregulación de la respuesta inmune innata se ha asociado con la fatalidad de la infección por H5N1, no se sabe si está relacionado directamente con la función de la NS1 o por los niveles de replicación elevados de estos virus (108).

En la proteína NS1 existen residuos específicos de aminoácidos que incrementan la virulencia de los virus influenza. Los virus IAAP H5N1 que son patogénicos en ratones, contienen glutámico de forma preferencial al aspártico en la posición 92 de la NS1 (109). La presencia de E92 en la

proteína NS1 permite la replicación viral en presencia de IFN *in vitro* y se asoció a patogenicidad en cerdos. De igual forma, un cambio de prolina por serina en la posición 42 (P42S) resultó en el incremento sustancial de la virulencia en ratones y en la reducción de IFN- α/β *in vitro* (110). Las sustituciones de leucina por fenilalanina en la posición 103 (L103F) y de isoleucina por metionina en la posición 106 (I106M) en la proteína NS1 de los virus IAAP H5N1, favorecen la replicación viral *in vitro* (111). La región carboxiterminal de la proteína NS1 puede influir en la patogenicidad debido a la presencia de 4 aminoácidos que integran una región motivo del ligando PDZ, y aunque no se conoce su función exacta en la patogénesis, parece ser independiente del papel antagónico de la NS1 para el IFN (112, 113).

II.6.2 Factores del hospedero.

II.6.2.1 Citocinas y quimiocinas proinflamatorias.

Cuando los virus influenza infectan las células epiteliales del TR, se producen una serie de eventos intracelulares complejos. Para el inicio de estos eventos, es necesario el reconocimiento de los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs, del inglés, pathogen-associated molecular patterns). Los PAMPs (proteínas y los ácidos nucleicos virales) interactúan con los receptores de reconocimientos de patrones (PRRs, del inglés, pathogen recognition receptors) (114). Existen tres clases de PRRs con una función importante en el monitoreo de la infección por los virus influenza: receptores tipo toll (TLR, del inglés, Toll-like receptor) 2, 3, 7 y 8 (proteínas con un dominio de unión a nucleótidos que contiene regiones repetidas ricas en leucina), el ácido retinoico inducible asociado al gen I (RIG-I, del inglés, retinoic acid-inducible gene-I), y los receptores tipo NOD (NLRs, del inglés, NOD-like receptor) (115).

Como resultado de la interacción de los PRRs y los PAMPs se producen las moléculas del sistema inmune innato, nuestra primera línea de protección contra las infecciones, donde podemos citar al IFN- α/β , las citocinas proinflamatorias y las quimiocinas. Aquí se incluyen las interleucinas (IL) que son esenciales para la activación de las células inmunes, y a las proteínas quimo atrayentes que participan en el reclutamiento de las células inmunes al sitio de infección. La respuesta inmune innata se activa en el transcurso de minutos a horas después de iniciada la infección. Las proteínas secretadas por las células actúan colectivamente a nivel local y

sistémico, para dirigir la expresión de un rango amplio de proteínas que actúan directamente sobre el virus o estimulan la inflamación. Sin embargo, la estimulación excesiva y la falta de control de la respuesta inmune innata pueden hacer de esta un componente dañino. Esto puede contribuir a la virulencia de los virus patogénicos, debido a la infiltración excesiva de las células inmunes en los tejidos que causan su destrucción (116).

La respuesta inflamatoria produce un deterioro directo en el tejido e induce síntomas respiratorios. También daña al hospedero indirectamente debido a que las células inflamatorias liberan citocinas pirogénicas que no solo inducen la fiebre, sino que también contribuyen a los signos y síntomas constitucionales de la influenza. Esta respuesta es protectora en principio, pero cuando se afecta su balance, como ocurre durante la infección con el virus IAAP H5N1, la superproducción de citocinas pro-inflamatorias es extremadamente severa e incluso fatal (117).

En los humanos, la infección por los virus IAAP produce niveles elevados de la proteína inducible IFN- γ de 10kDa (IP10 o CXCL10, del inglés, interferon-inducible protein-10), la proteína quimo atrayente de monocitos (MCP1 o CCL2, del inglés, monocyte chemotactic protein), IL-8, IL-6, IL-10 y otras citocinas pro-inflamatorias en el plasma. Estas se correlacionan con una carga viral elevada en la faringe y una frecuencia mayor de muertes por neumonías virales (87). Existen otras quimiocinas que también son importantes en la inflamación inducida por los virus influenza, entre ellas está la quimiocina expresada y secretada por las células T normales reguladas tras la activación (RANTES o CCL5, del inglés, regulated upon activation, normal T-cell expressed and secreted). RANTES es un quimo atrayente de monocitos, basófilos y células T, que puede encontrarse en las secreciones nasales de los pacientes afectados por una infección del TRS, ya sea por los virus influenza, parainfluenza, adenovirus o virus sincitial respiratorio (VSR) (118).

RANTES también participa en la inhibición de la apoptosis de las células infectadas por los virus influenza a través de su interacción con el receptor CCR5. Normalmente, la apoptosis de las células infectadas es útil para la defensa del hospedero. Sin embargo, los macrófagos (MØ) infectados resisten la muerte celular a través de esta interacción, con el fin de eliminar las células apoptóticas de los tejidos infectados. Si este proceso de eliminación se interrumpe, los patógenos

que permanecen en las células apoptóticas residuales y en los MØ activados, causan un daño adicional al tejido (119).

II.6.2.2 Polimorfismo del receptor CCR5.

La respuesta inmune contra los patógenos, depende del patrón complejo que ocurre durante el tráfico de leucocitos. Este es coordinado por las quimiocinas y sus receptores, elementos que dirigen a las células mononucleares a través del organismo y originan la respuesta inmune, aunque también contribuyen a la patogénesis (120, 121).

Entre los receptores de quimiocinas que captaron la atención en los últimos años está el receptor tipo 5 para el grupo de quimiocinas CC (CCR5, del inglés, C-C chemokine receptor type 5). El CCR5 se expresa en los monocitos y en los linfocitos T (LØT, del inglés, T lymphocyte), especialmente en las células T auxiliaadoras tipo 1 (Th1, del inglés, helper T lymphocyte-1). El gen que codifica para este receptor presenta un polimorfismo genético consistente en la delección de 32 pares de bases (CCR5Δ32) en el marco de lectura abierto, lo que trae como consecuencia una deficiencia funcional del CCR5 debido a la ausencia de expresión sobre la membrana. Fenotípicamente, los individuos heterocigóticos expresan una cantidad muy baja del receptor en comparación con los individuos homocigóticos de fenotipo salvaje (122).

Un estudio realizado en el año 2006 reveló que la condición homocigótica del CCR5Δ32 se asoció con un riesgo mayor de padecer la infección por el virus del Nilo occidental (VNO) de forma sintomática con un desenlace fatal (123). También se encontraron evidencias de la participación de este receptor en la respuesta inmune frente a la infección por los virus influenza, donde se demostró que el reto de ratones deficientes de CCR5 (CCR5^{-/-}) con los virus influenza, aumentó la tasa de mortalidad debido a una neumonía aguda severa (88). En el año 2005, se obtuvo el mismo resultado ante el reto en ratones CCR5^{-/-} y RANTES^{-/-} (119). El estudio más reciente del CCR5 se realizó con el virus influenza A(H1N1)pdm09, en el mismo se observó una frecuencia elevada del CCR5Δ32 heterocigótico en los pacientes que padecieron la forma más severa de la enfermedad, incluso la muerte (124).

II.7 Glicosilaciones en las proteínas de los virus influenza.

La N-glicosilación es una de las formas más comunes de modificación de las proteínas, a través de ella se enlaza un núcleo de manosa al nitrógeno de la amida en la asparagina, que se ubica en el contexto de una región motivo conservada de N-X-S/T (Asparagina-X-Serina/Treonina, donde X es cualquier aminoácido excepto prolina). Esta modificación ocurre en las etapas tempranas de la síntesis proteica, y continua con un proceso complejo de cortes y reformas de oligosacáridos durante el tránsito a través del retículo endoplasmático (RE) y el aparato de Golgi (AG). Como resultado, se obtiene una glicoproteína con una variedad de estructuras de oligosacáridos. Los virus utilizan este proceso de las células del hospedero para modificar las proteínas presentes en su superficie, lo que repercute sobre la estabilidad de las glicoproteínas virales, su antigenicidad y función durante la invasión de la célula hospedera. Estas modificaciones al menos provocan dos cambios fundamentales en el ciclo de vida del virus (104).

En primer lugar, la N-glicosilación de las proteínas de superficie propicia un plegamiento adecuado con el subsiguiente tráfico mediado por las chaperonas celulares y los factores de plegamiento. Durante la evolución viral, se ha visto que la ganancia y pérdida de los sitios de N-glicosilación ocurre con cierta facilidad, brindando una diversidad potencial de modificación, y una complejidad mayor de las glicoproteínas virales. La alteración de un sitio o sitios de N-glicosilación puede tener un impacto importante en la supervivencia y transmisibilidad del virus. Los cambios pueden alterar el plegamiento y la conformación, afectando porciones en toda la molécula (125).

En segundo lugar, los cambios en la glicosilación pueden afectar la interacción de la proteína con los receptores celulares, hacer del virus una diana más accesible a los factores innatos de las células inmunes del hospedero y menos accesible para los anticuerpos. Esto impacta además en la replicación viral y en la infectividad. Muchos virus que tienen una gran importancia médica utilizan la glicosilación para funciones importantes en la patogénesis y en la evasión de la respuesta inmune, entre ellos se pueden citar: los virus influenza, el VIH, los virus de la hepatitis y el VNO, entre otros (104, 126).

En los virus influenza la HA es su glicoproteína principal y constituye la diana de los anticuerpos para neutralizar la infectividad viral. La acumulación de una serie de sustituciones de aminoácidos bajo la presión selectiva de la respuesta inmune del hospedero, produce cambios antigénicos en la HA de los virus influenza. Las sustituciones de aminoácidos relacionadas con la aparición de cadenas de oligosacáridos en la región de la cabeza globular, generan variantes antigénicas de forma eficiente (127).

Durante cuatro décadas de circulación del virus influenza A(H3N2) en la población humana, aumentó el número de sitios posibles a ser N-glicosilados en la región de la cabeza globular de la HA (128). La mayoría de las variantes genéticas del virus influenza A(H3N2) en la actualidad tienen seis o siete regiones potenciales de N-glicosilación en la cabeza globular de la HA, mientras que la cepa prototipo A/Hong Kong/1/68 (H3N2) aislada en el año 1968 tiene solo dos sitios. Desde su re-emergencia en 1977, el virus influenza A(H1N1) circuló en la población humana durante 30 años. Los aislamientos recientes tienen más sitios de N-glicosilación en las secuencias de sus hemaglutininas que la cepa pandémica A/South Carolina/1/1918 (H1N1) (129). En contraste, la HA de los virus influenza A(H2N2) no adquirió sitios nuevos de N-glicosilación durante el período en el que causaron epidemias. Estas observaciones epidemiológicas llevaron al planteamiento de la hipótesis de que la adición de cadenas nuevas de carbohidrato en la HA es un factor importante para la circulación sostenida de los virus influenza en la población humana (128, 130).

Al analizar los cambios en los codones de la cabeza globular de la HA en los últimos 39 años, se observó que se necesitaban de uno a tres cambios nucleotídicos para convertirse en sitio potencial de N-glicosilación. De esta forma, los conjuntos de tres codones que necesitaron de una sustitución nucleotídica simple, doble o triple, fueron denotados como sitios Cand1, Cand2 y Cand3, respectivamente (131). Se cree que la presencia de los sitios Cand1, Cand2 y Cand3 en las cepas del virus influenza A(H3N2) estacionales facilitó su escape de la neutralización por los anticuerpos generados contra la cepa pandémica de este mismo subtipo, siendo un requisito para lograr su circulación continua en la población. Para el caso del virus influenza A(H1N1), la presencia de estos sitios propició su evolución en la población humana (127, 131).

II.8 Drogas antivirales anti-influenza: Resistencia.

Las drogas antivirales se utilizan con fines profilácticos y terapéuticos durante los eventos epidémicos estacionales. Adicionalmente, los antivirales son importantes durante el inicio de una pandemia de diseminación rápida, debido al tiempo que se necesita para producir cantidades suficientes de vacunas efectivas. En la actualidad existen dos clases de drogas antivirales disponibles para el tratamiento y la profilaxis de las infecciones por los virus influenza: los bloqueadores del canal M2 o adamantanos (amantadina y rimantadina) y los inhibidores de la NA (oseltamivir/Tamiflu y zanamivir/Relenza) (132).

II.8.1 Bloqueadores del canal M2.

Los adamantanos interfieren en el desnudamiento viral dentro de la célula hospedera. Estos compuestos son activos solamente contra los virus influenza A y están asociados con efectos tóxicos y con la emergencia rápida de variantes virales resistentes a las drogas. Los aislamientos de virus influenza A resistentes a los adamantanos son genéticamente estables, se transmiten a los contactos susceptibles y son tan patogénicos como los virus salvajes. Estos pueden excretarse por períodos de tiempo prolongados en pacientes inmunocomprometidos que reciben esta terapia antiviral. Esta característica limita el uso de los adamantanos para el tratamiento de la Influenza (133).

La sustitución en al menos uno de los cinco residuos del dominio de transmembrana de la proteína M2 (con frecuencia mayor: L26F, V27A, A30T, S31N, y G34E), confiere resistencia a los adamantanos (134, 135). Los mutantes resistentes a la amantadina o rimantadina tienen resistencia cruzada, es decir, el hecho de ser resistente a uno de ellos también produce resistencia al otro. La mayoría de las variantes resistentes a los adamantanos del virus influenza A(H3N2) contienen la mutación S31N (136-141), mientras que la V27A es más frecuente en el virus influenza A(H1N1) estacional (138). Aunque la resistencia emerge espontáneamente en los pacientes tratados con la droga, las variantes resistentes se transmiten de una persona a otra (142, 143).

Durante los brotes de Influenza aviar y del síndrome respiratorio agudo severo (SARS, del inglés) se produjo un incremento en el uso de las drogas antivirales, apareciendo la resistencia a los adamantanos por primera vez en Asia. Sin embargo, estos factores no explican la diseminación continua de los virus resistentes en todo el mundo y su dominancia en un ambiente de presión selectiva baja o nula debido al uso de la droga. Posteriormente se planteó que la diseminación de los mutantes resistentes fue el resultado de la asociación con otras mutaciones ventajosas desconocidas (144).

En los últimos años, se observó un incremento en la frecuencia de detección de virus influenza A(H3N2) resistentes a los adamantanos, entre el 2% al 90% en diferentes países del mundo, todos asociados a la sustitución S31N en la proteína viral M2. Durante el período 1991-1995, la resistencia a los adamantanos mostró una frecuencia global menor que el 1% para el virus influenza A(H3N2). Sin embargo, en un estudio realizado por Bright y colaboradores que incluyó secuencias del virus influenza A(H3N2) de todo el mundo durante una década, encontraron que la incidencia se incrementó hasta el 12% en el año 2004. Al siguiente año, el incremento alcanzó el 96%, 72% y 14.5% en China, Korea del Sur y Estados Unidos, respectivamente (136, 140). Con respecto al virus influenza A(H1N1) estacional, el incremento en los niveles de resistencia a los adamantanos alcanzaron el 15% en todo el mundo durante el período 2005-6 (145).

II.8.2 Inhibidores de la neuraminidasa.

Los inhibidores de la neuraminidasa interfieren con el proceso de liberación de la progenie de los virus influenza desde las células infectadas, lo que impide la infección de otras células del hospedero y detiene la diseminación del virus en el TR. Estos compuestos son efectivos contra los virus influenza A y B (incluyendo todos los subtipos de los virus influenza A), algo esencial en la preparación contra epidemias y pandemias. En contraste con los adamantanos, los INAs se asocian con niveles bajos de toxicidad, y menor frecuencia de aparición de resistencia. (133).

Los aminoácidos que rodean al sitio activo de esta enzima e interactúan directamente con el sustrato son estrictamente conservados en los virus influenza A y B (146). Existen ocho aminoácidos (R118, D151, R152, R224, E276, R292, R371, y Y406) que se reconocen como residuos catalíticos debido al contacto directo con el sustrato y su repercusión crítica en la

función de la NA. Se han descrito otros diez residuos (E119, R156, W178, S179, D198, I222, E227, E277, N294, y E425) que rodean la estructura y están implicados en la estabilización del sitio activo (147).

La OMS anunció un incremento en la circulación de variantes del virus influenza A(H1N1) estacional resistentes al oseltamivir en Japón, portadoras de la mutación H275Y en la NA. El incremento fue del 3% en la temporada 2007-2008 al 97% durante la temporada 2008-2009 (148).

La frecuencia de aparición de mutantes resistentes y su transmisibilidad en los virus influenza B ha sido poco estudiada. Las dos variantes de los virus influenza B con sensibilidad reducida a los INAs (R152K y D198N), se aislaron a partir de niños inmunocomprometidos tratados con oseltamivir (149, 150).

Las sustituciones que se identificaron en la neuraminidasa de los virus resistentes a los INAs en los humanos, son tipo o subtipo-específicas. Los cambios glutámico por valina en la posición 119 (E119V), arginina por lisina en la posición 292 (R292K) y asparagina por serina en la posición 294 (N294S) ocurren en subtipo N2. La sustitución histidina por tirosina en la posición 275 (H275Y) ocurre en el subtipo N1 (tanto para influenza A(H1N1) como A(H5N1)). Por último, los cambios R152K y D198N se observan en la NA de los virus influenza B (149-152).



Capítulo III
MATERIALES Y MÉTODOS

III. MATERIALES Y MÉTODOS

III.1 Diseño general de la investigación.

En esta investigación se realizaron tres estudios para determinar la circulación de diferentes variantes genéticas de los virus influenza A y B en Cuba y la relación de marcadores de la respuesta inmune del hospedero con la severidad de la enfermedad:

1. Estudio analítico de corte transversal para determinar la circulación de variantes genéticas de los virus influenza A y B en Cuba durante el período 2006-2010 (corresponde al objetivo 1).
2. Estudio descriptivo de casos para determinar la relación de marcadores de la respuesta inmune con la forma severa de enfermedad producida por el virus influenza A(H1N1)pdm09 en abril-diciembre/2009 (corresponde al objetivo 2).
3. Estudio analítico de corte transversal para determinar la circulación de variantes genéticas de los virus influenza resistentes a los bloqueadores del canal M2 y a los inhibidores de la neuraminidasa durante el período 2006-2010 (corresponde al objetivo 3).

III.2 Determinar la circulación de variantes genéticas de los virus influenza A y B durante el período de estudio. (Estudio 1).

Para determinar la circulación de variantes genéticas de los virus influenza A y B en Cuba durante el período 2006-2010, se aplicaron técnicas moleculares en la obtención de secuencias nucleotídicas para los análisis filogenéticos.

III.2.1 Muestra.

Se utilizaron 107 muestras clínicas del período 2006-2010 diagnosticadas mediante RCP como positivas a los virus influenza A o B y negativas a otros virus respiratorios (influenza C, adenovirus, virus sincitial respiratorio A y B, parainfluenza 1-4, enterovirus, rinovirus, coronavirus OC43 y

229E, bocavirus y metapneumovirus). Las muestras se obtuvieron del Laboratorio Nacional de Referencia de Influenza (LNRI) del Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí” (IPK).

La distribución de las muestras positivas a los virus influenza estacionales fue: 22 influenza A(H3N2), 14 influenza A(H1N1) estacional y 23 influenza B. Las 48 muestras positivas al virus influenza A(H1N1)pdm09 que se utilizaron en este estudio, representan cuatro momentos de la pandemia (Inicio, Ola epidémica 1 (OE-1), OE-2 y Final) (Figura III.1).

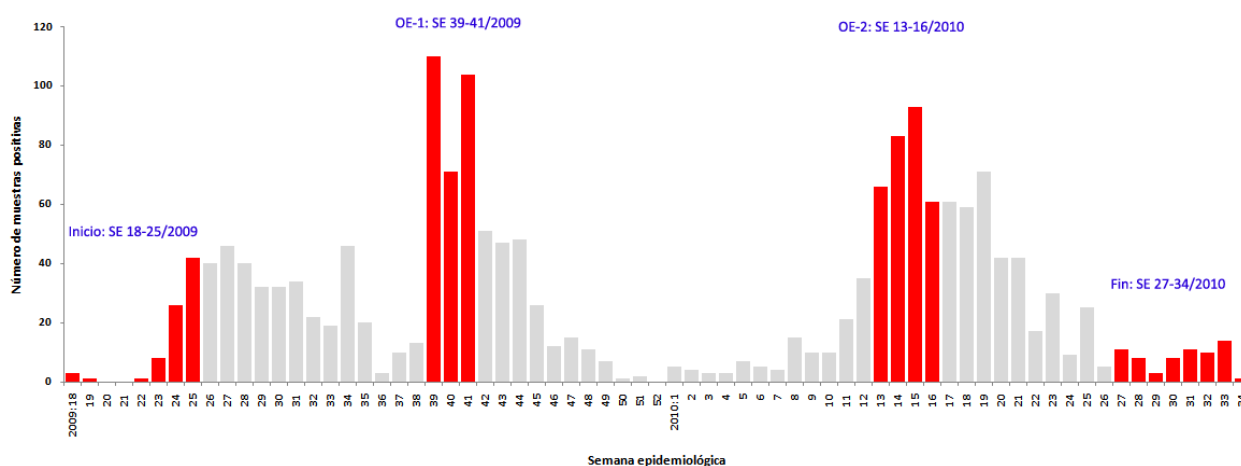


Figura III.1. Distribución de las muestras positivas al virus influenza A(H1N1)pdm09 por semana epidemiológica durante el período pandémico. Las barras en rojo se corresponden con los períodos a los que pertenecen las muestras que se utilizaron.

III.2.2 Extracción de ARN.

Para la extracción del ARN a partir de las muestras de exudado nasofaríngeo (ENF) se empleó una alícuota de 140µL para cada extracción, con un volumen de elución final de 60µL.

Para las muestras de tejido pulmonar, la ruptura y homogenización del mismo (5mg) se realizó de forma automatizada en el TissueLyser II (QIAGEN, EUA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se empleó una alícuota de 140µL del homogenato obtenido para el proceso de extracción, con un volumen de elución final de 60µL.

El ARN viral se obtuvo de forma automatizada en el extractor automático QIAcubeTM (QIAGEN, EUA) con el estuche comercial QIAamp[®] Viral RNA (QIAGEN, EUA) siguiendo las indicaciones del fabricante.

III.2.3 TR-RCP anidada para la amplificación de un segmento de la región HA1 de la hemaglutinina de los virus influenza A(H1N1), A(H1N1)pdm09, y A(H3N2).

La mezcla de la reacción se preparó utilizando el estuche comercial OneStep RT-PCR (QIAGEN, EUA), siguiendo las recomendaciones del fabricante y utilizando los cebadores descritos en la tabla III.1, a una concentración final de 0.4μM en 50μL de volumen final. Se adicionaron 5μL del ARN extraído a la mezcla de reacción (153).

Tabla III.1. Secuencia de los cebadores que se emplearon para la amplificación de un segmento de la región HA1 de la hemaglutinina de los virus influenza A(H1N1) estacional, A(H1N1)pdm09 y A(H3N2).

Reacción	Cebador	Secuencia 5'-3'	Tamaño del producto (pb)	Referencia
TR-RCP	PHA1+	GGG GTT AGC AAA AGC AGG RG		
	PHA1-	CAW CCR KCI AYC AKI CCW KIC CAI CC		
RCP anidada	H1+SSEQ	CAA TAT GTA TAG GCT ACC ATG C	980	(104, 153)
	H1-ASEQ	CCC TCA ATR AAA CCR GCA AT		
	H3+SSEQ	GAC ACC ATG CAG TGC CAA	1100	
	H3-ASEQ	CCC TCC CAA CCA TTT TCT AT		

La reacción de amplificación se realizó en un equipo de RCP (QANTARUS, Alemania) con las siguientes condiciones: 30 minutos a 50°C; 15 minutos a 95°C; 40 ciclos de 94°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos y 68°C durante 40 segundos; y 68°C durante 5 minutos.

Posteriormente se realizó la RCP anidada, con una mezcla compuesta por los cebadores descritos en la tabla III.1 a 0.4μM en 50μL de mezcla, 10μL de solución tampón 5X (154), 2μL de una mezcla de dNTPs a 10mM y 2μL de la enzima Amplitaq (Applied Biosystems, EUA). A la mezcla se le adicionaron 2μL del producto de la primera reacción (153).

La reacción de amplificación se realizó en un equipo de RCP (QANTARUS, Alemania) con las siguientes condiciones: 15 minutos a 95°C; 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos y 68°C durante 40 segundos; y 68°C durante 5 minutos.

Al finalizar la segunda reacción se mezclaron 8μL del producto amplificado con 2μL de tampón estabilizador de muestra 6X (EDTA 500mM, glicerol al 10%, azul de bromofenol al 0.01%). Los productos se detectaron en un gel de agarosa al 2% en tampón TBE 1X (Tris-borato 40mM, EDTA

2mM pH 8.0) teñido con Bromuro de Etidio (0,5 mg/mL) (Sigma, EUA). Concluida la electroforesis que se realizó durante 40 minutos a 120V, el producto amplificado se visualizó en un transiluminador de luz ultravioleta (Spectroline® Bi-O-Vision™, Alemania). Se utilizó el marcador de peso molecular DNA ladder 100bp (PROMEGA, EUA) para comprobar la longitud esperada del producto (Tabla III.1).

III.2.4 TR-RCP anidada para la amplificación de un segmento de la región HA1 de la hemaglutinina de los virus influenza B.

Los protocolos utilizados en este acápite pertenecen al Laboratorio de Gripe del Instituto de Salud Carlos III de Madrid, España. Se obtuvieron por comunicación personal.

La mezcla de la primera reacción se preparó de igual manera que en el acápite III.2.3, utilizando los cebadores descritos en la tabla III.2 a una concentración final de 0.4μM en 50μL de volumen final. Se adicionaron 5μL del ARN extraído a la mezcla de reacción.

Tabla III.2. Secuencia de los cebadores utilizados en las reacciones de amplificación de un segmento de la región HA1 de la hemaglutinina de los virus influenza B.

Reacción	Cebador	Secuencia 5'-3'	Tamaño del producto (pb)	Referencia
TR-RCP	B2+	CKTCAAACCTCACCYCATGTGG	822	Donados por el Laboratorio de Gripe del Instituto de Salud Carlos III, España.
	B11-	AACCCCTTTTCCTTTAATAGTTT		
RCP anidada	B22+	CAAGGGGARGTCAATGTGAC	822	del Instituto de Salud Carlos III, España.
	B22-	CAATTCCTATGGCTTTTGCATG		

La reacción de amplificación se realizó en un equipo de RCP (QANTARUS, Alemania) con las siguientes condiciones: 45 minutos a 50°C; 15 minutos a 94°C; 45 ciclos de 94°C por 30 segundos, 55°C por 60 segundos y 68°C durante 30 segundos; y 68°C durante 5 minutos.

La RCP anidada se realizó a partir de una mezcla constituida por los cebadores descritos en la tabla III.2, con las mismas características que la reacción anidada realizada para los virus influenza A en el acápite III.2.3. A la mezcla se le adicionaron 2μL del producto de la primera reacción.

La reacción de amplificación se realizó en un equipo de RCP (QANTARUS, Alemania) con las siguientes condiciones: 3 minutos a 94°C; 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 55°C por 120 segundos y 72°C durante 30 segundos; y 72°C durante 5 minutos.

Para la visualización del producto de la segunda reacción se procedió como fue descrito en el acápite III.2.3.

III.2.5 Secuenciación nucleotídica de un segmento de la región HA1 de la hemaglutinina de los virus influenza A y B.

III.2.5.1 Purificación de los productos de RCP.

Los productos de la RCP se purificaron de forma automatizada en el extractor automático QIAcubeTM (QIAGEN, EUA), con el estuche comercial QIAquick[®] PCR purification (QIAGEN, EUA), según las indicaciones del fabricante.

La calidad de la purificación se evaluó mediante electroforesis horizontal en gel de agarosa al 2% (acápite III.2.3). También se estimó la concentración final del producto purificado mediante comparación visual con el marcador de peso molecular DNA ladder 100bp (PROMEGA, EUA).

III.2.5.2 Secuenciación nucleotídica.

Para la reacción de secuencia se utilizó el estuche comercial GenomeLabTM Dye Terminator Cycle Sequencing (Beckman Coulter, EUA), según las indicaciones del fabricante. Los cebadores que se emplearon para secuenciar un fragmento de la región HA1 de la HA de los virus influenza A y B se describieron en la reacción anidada de las tablas III.1 y III.2 respectivamente, a una concentración de 5µM y con una temperatura de hibridación de 55°C. La concentración de trabajo de cada uno de los cebadores fue de 5µM. La reacción de amplificación se realizó en un equipo de RCP (QANTARUS, Alemania) con las siguientes condiciones: 40 ciclos de 96°C por 20 segundos, 55°C por 20 segundos y 60°C durante 4 minutos.

Al concluir la reacción de secuencia, el producto se purificó según el estuche comercial GenomeLabTM Dye Terminator Cycle Sequencing (Beckman Coulter, EUA), siguiendo las indicaciones del fabricante. Al final, los productos purificados de la reacción de secuencia se

resuspendieron en 40µL de formamida y se separaron por electroforesis capilar en un secuenciador automático (CEQ 8800 Genetic Analyzer System, EUA).

Las secuencias de los virus estacionales se editaron y ensamblaron en el paquete MEGA 5 v.5.03 (155), utilizando las cepas de referencia de cada temporada obtenidas en la base de genes GenBank (Anexo 2). Las secuencias cubanas obtenidas en este acápite se publicaron en la base de genes GenBank y sus números de acceso se muestran en el anexo 3. En el caso del virus pandémico influenza A(H1N1)pdm09, la edición de las secuencias obtenidas a partir de las muestras de pacientes cubanos, se realizó tomando como referencia la secuencia de la cepa de la vacuna (A/California/07/2009 (H1N1)pdm09: FJ966974). Las secuencias cubanas se publicaron en la base de genes GenBank (Anexo 4).

III.2.5.3 Análisis filogenético.

Se aplicó la misma metodología para los análisis de las secuencias de los virus influenza A y B estacionales. La distancia genética entre las secuencias cubanas y las de referencia se calculó con el programa MEGA 5 v.5.03 mediante el modelo Kimura-2-parámetros con un análisis de re-muestreo (bootstrap, del inglés, re-sampling) de 1 000 réplicas. Los árboles filogenéticos se construyeron con el programa bioinformático Mr.Bayes v.3.1.2 (156), con la incorporación de los modelos de sustitución nucleotídica que se determinaron con el programa ModelGenerator v.0.85 (157). Finalmente, el número de generaciones y la frecuencia de muestreo de los datos se fijaron a 5 000 000 y 1 000, respectivamente. Los árboles se visualizaron con el programa bioinformático Dendroscope v.2.7.4 (158), cada grupo definido se apoyó estadísticamente con un valor de Probabilidad Posterior Bayesiana (BPP, del inglés, Bayesian Posterior Probability).

Para el virus influenza A(H1N1)pdm09, la distancia genética se calculó con el mismo procedimiento que se utilizó para los virus influenza estacionales, se tomó como referencia el linaje de la vacuna A/California/07/2009 (H1N1)pdm09: FJ966974. El árbol filogenético se construyó con el programa bioinformático BEAST v.1.5.4 (159), con la incorporación de los modelos de sustitución nucleotídica que se determinaron mediante el programa ModelGenerator v.0.85 (157). Finalmente, el número de generaciones y la frecuencia de muestreo de los datos se fijaron a 10 000 000 y 1 000, respectivamente. Para analizar la convergencia de los parámetros de

salida se utilizó la herramienta Tracer v.1.5. Los árboles de credibilidad máxima de grupos (MCC, del inglés, Maximum Clade Credibility) se resumieron utilizando el programa TreeAnnotator v.1.5.4, después de la eliminación del 25% de las cadenas. El árbol filogenético se visualizó en el programa bioinformático Dendroscope v.2.7.4 (158). La predicción de los sitios de N-glicosilación, se realizó con la herramienta NetNGlyc 1.0 Server disponible en internet (160), a través de la búsqueda de la secuencia de aminoácidos Aspargina-Xaa-Serina/Treonina, donde Xaa es cualquier aminoácido excepto la Prolina.

III.3 Determinar la relación de los niveles de expresión del ARN de IL-1 β , IL-8, RANTES y el TLR-2 y la presencia del CCR5 Δ 32, con la forma severa de la enfermedad producida por el virus influenza A(H1N1)pdm09 en abril-diciembre/2009. (Estudio 2).

Para determinar la relación de marcadores de la respuesta inmune con la forma severa de enfermedad producida por el virus influenza A(H1N1)pdm09 en abril-diciembre/2009, se aplicaron técnicas moleculares de identificación y cuantificación relativa. Durante los primeros meses de la pandemia (abril-diciembre/2009), en Cuba se registró un incremento inusual de las IRAGs y los fallecimientos producidos por el virus influenza A(H1N1)pdm09 en los pacientes de hasta 55 años de edad. Este comportamiento no es típico durante la Influenza estacional, donde la relación entre la edad y la mortalidad asociada I-N muestra típicamente forma de “U”, indicando un riesgo mayor para las edades extremas de la vida (7).

III.3.1 Muestra.

Se utilizaron muestras diagnosticadas mediante RCP como positivas al virus influenza A(H1N1)pdm09 y negativas a otros virus respiratorios (influenza C, adenovirus, virus sincitial respiratorio A y B, parainfluenza 1-4, enterovirus, rinovirus, coronavirus OC43 y 229E, bocavirus y metapneumovirus). Las muestras se obtuvieron del LNRI del IPK.

En este objetivo se utilizó la clasificación de ETI, IRAG y fallecido, realizada por el médico de asistencia según las definiciones de la OMS referentes a la severidad de la enfermedad producida por el virus influenza A(H1N1)pdm09 (161). Se utilizaron 76 muestras (ETI=9; IRAG=43; Fallecidos=24) pertenecientes al período abril-diciembre/2009 (Figura III.2). Como controles

negativos se incluyeron diez muestras de exudado nasofaríngeo provenientes de individuos sanos y cinco de tejido pulmonar de fallecidos, negativas a influenza (influenza A, B y C) y a otros virus respiratorios (adenovirus, virus sincitial respiratorio A y B, parainfluenza 1-4, enterovirus, rinovirus, coronavirus OC43 y 229E, bocavirus y metapneumovirus).

En la figura III.2 se representó la distribución de las muestras positivas al virus influenza A(H1N1)pdm09, según su clasificación en ETI, IRAG o fallecido en el período de estudio.

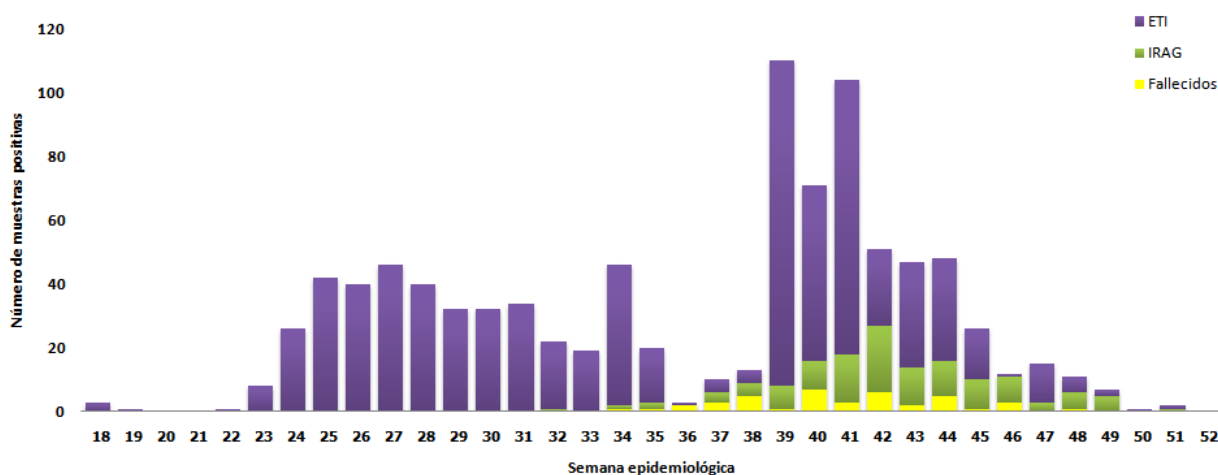


Figura III.2. Distribución de las muestras positivas al virus influenza A(H1N1)pdm09 en el período abril-diciembre/2009, clasificadas como ETI, IRAG y Fallecidos.

III.3.2 Extracción del ARN.

Para la extracción del ARN se procedió según lo descrito en el acápite III.2.2.

III.3.3 Cuantificación relativa de los niveles de expresión del ARN de IL-1 β , IL-8, RANTES y el TLR-2 en los grupos analizados.

La cuantificación relativa de la expresión del ARN de IL-1 β , IL-8, RANTES y el TLR-2 se realizó en las 76 muestras en estudio y en los controles negativos. El gen de la β -Actina se empleó como control interno para normalizar la cantidad de ARN que se adicionó. Como calibrador para los exudados nasofaríngeos se utilizaron las 10 muestras de igual localización anatómica, negativas a los virus influenza y otros virus respiratorios, obtenidas a partir de individuos sanos. Como calibrador para los tejidos pulmonares, se utilizaron las cinco muestras

de pulmón, negativas a los virus influenza y otros virus respiratorios. El cambio en los niveles de expresión de los genes de las citocinas, quimiocinas y el TLR-2 en las muestras incluidas en el estudio, se estimó relativo a los calibradores mediante el método de Livak (162).

III.3.3.1 TR-RCP en tiempo real semicuantitativa utilizando SYBR Green.

Para la preparación de la mezcla de reacción se empleó el estuche comercial *QantiFastTM SYBR[®] Green TR-RCP* (QIAGEN, EUA) según las indicaciones del fabricante. Los cebadores aparecen descritos en la tabla III.3 y se emplearon a una concentración final de 1μM en 25μL de volumen final de reacción.

Tabla III.3. Secuencia de los cebadores utilizados en las reacciones de amplificación de la TR-RCP en tiempo real semicuantitativa.

Gen	Cebador	Secuencia 5'-3'	Tamaño del producto (pb)	Referencia
β-Actin	β-Actin +	TGACGGGGTACCCACACTGTGCCCATCT	600	(163)
	β-Actin -	CTAGAAGCATTGCGGTGGACGATGGAGGG		
IL-1β	IL1β +	AAACAGATGAAGTGCTCCTTCCAGG	300	(164)
	IL1β -	TGGAGAACACCACTTGTTGCTCCA		
IL-8	IL8+	ATGACTTCCAAGCTGGCCGTGGCT	289	(165)
	IL8-	TCT CAG CCC TCT TCA AAA ACT TCT C		
RANTES	RANTES+	ATGAAGGTCTCCGCGGCACGCCT	400	(165)
	RANTES-	CTAGCTCATCTCCAAAGAGTTG		
TLR-2	TLR2+	GCCAAAGTCTTGATTGATTGG	318	(166)
	TLR2-	TTGAAGTTCTCCAGCTCCTG		

La reacción de amplificación y la cuantificación relativa se realizó en un equipo de RCP en tiempo real (ABI PRISM[®] 7500 FAST, EUA). Las condiciones de amplificación se fijaron según el manual del estuche comercial: 10 minutos a 50°C; 5 minutos a 95°C; y 40 ciclos de 95°C por 10 segundos, 64°C por 30 segundos. Posteriormente se realizó la curva de disociación (melting curve; del inglés) para determinar la especificidad de los productos amplificados.

El nivel de expresión de cada uno de los genes se calculó mediante el método de Livak o $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (162) con el programa SDS V. 2.1 (Applied Biosystems, EUA). Los valores se expusieron como niveles de expresión del ARN diana en la muestra respecto al calibrador (unidades arbitrarias).

III.3.4 RCP para la detección de la delección $\Delta 32$ del CCR5.

III.3.4.1 Extracción del ADN.

Los ENF y los tejidos pulmonares se procesaron de manera similar a la metodología descrita en el acápite III.2.2.

El proceso de extracción del ADN se realizó de forma automatizada en el extractor QIAcubeTM (QIAGEN, EUA) con el estuche comercial QIAamp[®] DNA Mini Kit/250 (QIAGEN, EUA,) según las indicaciones del fabricante. Para la extracción se empleó una alícuota de 200 μ L de la muestra y se obtuvo un volumen de elución final de 50 μ L.

III.3.4.2 RCP para la detección de la delección de 32 pares de bases en el gen ccr5.

Para la detección de la delección $\Delta 32$ del CCR5 se emplearon los cebadores descritos en la tabla III.4, los cuales flanquean el sitio de la posible delección.

Tabla III.4. Secuencia de los cebadores utilizados en la reacción de amplificación para la detección de la delección $\Delta 32$ del CC.

Gen	Cebador	Secuencia 5' - 3'	Tamaño del producto (pb)	Referencia
CCR5	CCR51335	TCAAAAAGAAGGTCTTCATTACACC	CCR5+/+ (189)	(167)
			CCR5-/- (157)	
	CCR51336	TCCTGTGCCTCTTCTTCATTTTCG	CCR5+/- (157 y 189)	

Leyenda: CCR5+/+ (homocigótico salvaje); CCR5+/- (heterocigótico para la delección); CCR5-/- (homocigótico para la delección).

La mezcla de la reacción se preparó utilizando la enzima comercial Amplitaq DNA Polimerasa (Applied Biosystem, EUA), según las condiciones de reacción propuestas por el fabricante. Se utilizó la solución tampón de la reacción previamente publicada por Coiras y colaboradores (154). Los cebadores se utilizaron a una concentración final de 0.6 μ M en 50 μ L de volumen final de mezcla.

La reacción de amplificación se realizó en un equipo de RCP (QANTARUS, Alemania) en las siguientes condiciones: 3 minutos a 94°C; 40 ciclos de 94°C por 30 segundos, 58°C por 30 segundos y 72°C durante 30 segundos; y 72°C durante 2 minutos.

La detección del producto amplificado se realizó mediante una electroforesis en gel de agarosa al 2%, con la misma metodología que se escribió en el acápite III.2.3. Además del patrón de peso molecular se emplearon tres muestras como controles: una muestra homocigótica salvaje (CCR5+/+), una muestra heterocigótica para la delección (CCR5+/-), y finalmente una muestra homocigótica para la delección (CCR5-/-).

III.3.5 Análisis estadísticos.

Los análisis estadísticos se realizaron con el programa IBM SPSS Statistics v.19, a partir de la base datos creada con la información que se recopiló de los modelos de colecta de las muestras y los resultados que se obtuvieron en este estudio.

La significación estadística entre los niveles de expresión del ARN de IL1- β , IL-8, RANTES y el TLR-2 dentro de los grupos ETI, IRAG y fallecidos, se calculó mediante comparación de las medias con un ANOVA de un factor y una prueba posterior de Turkey, se consideraron significativos los valores de p menores de 0.05 (IBM SPSS Statistics v.19).

Se construyó una tabla de contingencia para comparar la presencia de la delección $\Delta 32$ del CCR5 y el desenlace fatal de la enfermedad producida por el virus influenza A(H1N1)pdm09. Se utilizó la prueba de *Chi* cuadrado y se consideraron significativos los valores de p menores de 0.05 (EPIDAT v.3.1.)

La significación estadística entre los niveles de expresión del ARN de RANTES entre los grupos fallecidos y no fallecidos (ETI + IRAG), se calculó con la prueba T, se consideraron significativos los valores de p menores de 0.05 (IBM SPSS Statistics v.19).

III.4 Identificar la circulación de variantes de los virus influenza resistentes a los bloqueadores del canal M2 y a los inhibidores de la neuraminidasa en el período de estudio.

Para determinar la circulación de variantes genéticas de los virus influenza resistentes a los bloqueadores del canal M2 y a los inhibidores de la neuraminidasa durante el período 2006-2010, se aplicaron técnicas moleculares en la obtención de secuencias nucleotídicas de los genes involucrados en la resistencia.

III.4.1 Muestra.

Se utilizaron 100 muestras del período 2006-2010 diagnosticadas mediante RCP como positivas a los virus influenza A o B y negativas a otros virus respiratorios (influenza C, adenovirus, virus sincitial respiratorio A y B, parainfluenza 1-4, enterovirus, rinovirus, coronavirus OC43 y 229E, bocavirus y metapneumovirus). Las muestras se obtuvieron del LNRI del IPK. En la tabla III.5 se expuso la distribución de la muestra.

Tabla III.5. Distribución de la muestra seleccionada, según estudios para la detección de resistencia a los bloqueadores del canal M2 o a los inhibidores de la neuraminidasa.

Resistencia bloqueadores de canal M2		Resistencia inhibidores de la NA	
influenza A(H3N2)	9	influenza A(H3N2)	17
influenza A(H1N1)	8	influenza A(H1N1)	8
influenza A(H1N1)pdm09	4	influenza A(H1N1)pdm09	47
		influenza B	7
Total	21	Total	79

III.4.2 Extracción de ARN

Para la extracción del ARN se procedió según lo descrito en el acápite III.2.2.

III.4.3 TR-RCP punto final para la amplificación de un segmento del gen de la matriz de los virus influenza A.

La mezcla de la reacción se preparó con el estuche comercial OneStep RT-PCR (QIAGEN, EUA) según las recomendaciones del fabricante, con los cebadores descritos en la tabla III.6 a una

concentración final de 0.4µM en 50µL de reacción. A la mezcla de reacción se añadieron 5µL del ARN extraído.

Tabla III.6. Secuencia de los cebadores utilizados en la reacción de amplificación de un segmento del gen de la proteína matriz de los virus influenza A.

Gen	Cebador	Secuencia 5'-3'	Tamaño del producto (pb)	Referencia
M	MF1	AGC AAA AGC AGG TAG ATA TTG AAA GA	1027	(168)
	MR1027	AGT AGA AAC AAG GTA GTT TTT TAC TC		

La reacción de amplificación se realizó en un equipo de RCP (QANTARUS, Alemania) con las siguientes condiciones: 30 minutos a 50°C; 15 minutos a 95°C; 40 ciclos de 94°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos y 68°C durante 40 segundos; y 68°C durante 5 minutos (168).

El tamaño de los productos de la RCP se comprobó en un gel de agarosa al 2%, como se describió previamente en el acápite III.2.3.

III.4.4 TR-RCP anidada punto final para la amplificación de un segmento del gen de la neuraminidasa de los virus influenza A.

La mezcla de la reacción se preparó con el estuche comercial OneStep RT-PCR (QIAGEN, EUA) según las recomendaciones del fabricante, con los cebadores descritos en la tabla III.7 a una concentración final de 0.4µM en 50µL de reacción. A la mezcla de reacción se adicionaron 5µL del ARN extraído (153).

La reacción de amplificación se realizó en un equipo de RCP (QANTARUS, Alemania) con las siguientes condiciones: 45 minutos a 45°C; 15 minutos a 95°C; 45 ciclos de 94°C por 60 segundos, 48°C por 2 minutos y 68°C durante 60 segundos; y 68°C durante 5 minutos.

La segunda amplificación se realizó con una mezcla compuesta por los cebadores descritos en la tabla III.7 a 0.4µM en 50µL de reacción, 10µL de solución tampón 5X (154), 2µL de una mezcla de dNTPs a 10mM y 2µL de la enzima Amplitaq (Applied Biosystems, EUA). A la mezcla de reacción se le añadieron 2µL del producto obtenido en la primera reacción (153).

Tabla III.7. Cebadores utilizados en las reacciones de amplificación de un segmento del gen de la neuraminidasa de los virus influenza A.

Reacción	Gen	Cebador	Secuencia 5´-3´	Tamaño del producto (pb)	Referencia
TR-RCP	N1-N9	NA+ NA-	GGGGTTAGCAAAAGCAGG CCTCTGATYAIYTCIACIYARAARCA		
RCP anidada	N1	N1T+	GCAAGYGCWTGYCATGATGGC	661	(153)
		N1T-	CCTGACCAATCAGTTATTGC		
	N2	N2T+	CAAGTARTGCYRTGTGARCC	817	
		N2T-	AGYCCTGAGCACACATAAC		

La reacción de amplificación se realizó en un equipo de RCP (QANTARUS, Alemania) con las siguientes condiciones: 3 minutos a 95°C; 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 63°C por 60 segundos y 72°C durante 60 segundos; y 72°C durante 5 minutos.

El tamaño de los productos se comprobó en un gel de agarosa al 2%, como se escribió descrito previamente en el acápite III.2.3.

III.4.5 TR-RCP punto final para la amplificación de un segmento del gen de la neuraminidasa de los virus influenza B.

La mezcla de la reacción se preparó con el estuche comercial OneStep RT-PCR (QIAGEN, EUA) según las recomendaciones del fabricante, con los cebadores descritos en la tabla III.8 a una concentración final de 0.4µM en 50µL de reacción. A la mezcla de reacción se adicionaron 5µL del ARN extraído.

Tabla III.8. Secuencia de los cebadores utilizados en la reacción de amplificación de un segmento del gen de la neuraminidasa de los virus influenza B.

Gen	Cebador	Secuencia 5'-3'	Tamaño del producto (pb)	Referencia
NA	BNAF1	AGCAGAAGCAGAGCATATTCTTAG	850	(168)
	BNAR2	GATGGACAAATCCTCCCTTGATGC		

La reacción de amplificación se realizó en un equipo de RCP (QANTARUS, Alemania) con las siguientes condiciones: 30 minutos a 50°C; 15 minutos a 95°C; 45 ciclos de 94°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos y 72°C durante 60 segundos; y 72°C durante 5 minutos (168).

El tamaño de los productos se comprobó en un gel de agarosa al 2%, como fue descrito previamente en el acápite III.2.3.

III.4.6 Secuenciación nucleotídica de un segmento de los genes de las proteínas matriz y neuraminidasa de los virus influenza A y neuraminidasa de los virus influenza B.

III.4.6.1 Purificación de los productos de RCP.

La purificación se realizó siguiendo la metodología descrita en el acápite III.2.5.1.

III.4.6.2 Secuenciación nucleotídica.

Se empleó la metodología descrita en el acápite III.2.5.2 para la preparación de mezclas y las condiciones de reacción. Se utilizaron los cebadores descritos en la tabla III.6 para la matriz, los de la reacción anidada de la tabla III.7 para la neuraminidasa de los virus influenza A, y los de la tabla III.8 para la neuraminidasa de los virus influenza B. Todos los cebadores se emplearon a una concentración de 5 μ M en un volumen final de reacción de 20 μ L. La purificación del producto, la secuenciación y la edición y ensamblaje se realizó según la metodología descrita en el acápite III.2.5.2. Para la edición de las secuencias obtenidas en este acápite, se utilizaron las secuencias de las cepas de referencia de cada temporada que aparecen en el anexo 5.

Las secuencias obtenidas en este estudio se publicaron en la base de genes del GenBank con un número de acceso (Anexo 6).

III.4.7 Análisis de marcadores moleculares relacionados con la resistencia a los adamantanos e inhibidores de la neuraminidasa.

Los análisis se realizaron mediante la comparación de las secuencias obtenidas con las secuencias de referencia (Anexo 5), tanto para la matriz como para la neuraminidasa, con el programa MEGA 5 v.5.03 (155).

III.5 Consideraciones éticas de la investigación.

Los estudios realizados se rigieron por las Guías internacionales como la Declaración de Helsinki y se cumplieron sus tres principios básicos, autonomía, beneficencia y justicia.

Las muestras clínicas que se emplearon en este estudio se recibieron en el LNRI, con su hoja de datos correspondiente. Con los datos clínicos de cada uno de los pacientes se confeccionó una base de datos a la que solo tuvo acceso el investigador principal del proyecto, el investigador sustituto y el estadístico. La base de datos se protegió con contraseña. Los resultados obtenidos no se asociaron con los nombres de los pacientes en ningún tipo de publicación de los resultados, cada paciente tuvo un código asignado que solo fue conocido por las personas con acceso autorizado a la base de datos.



Capítulo IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

IV.1 Determinar la circulación de variantes genéticas de los virus influenza A y B durante el período de estudio.

Los anticuerpos que neutralizan totalmente a los virus influenza están dirigidos contra la HA. Sin embargo, las mutaciones que se producen en la HA mediante mecanismos como la deriva antigénica o el salto antigénico, permite a los virus influenza evadir la inmunidad adquirida previamente a través de la vacunación o de forma natural. Teniendo esto en cuenta, cada año la OMS publica las recomendaciones para la composición de la vacuna anti-influenza en los hemisferios Norte y Sur, basándose en los datos epidemiológicos y en los análisis genéticos y antigénicos de las cepas circulantes. La capacidad de seleccionar los linajes adecuados para la vacuna estacional de una temporada, garantiza niveles de protección más elevados en los grupos poblacionales vacunados. Esto se traduce en lograr que el nivel de analogía genética y antigénica entre los linajes de la vacuna estacional y las cepas circulantes sea lo más alto posible.

Los estudios de filogenia detectan mutaciones que permiten al virus evadir los anticuerpos generados por la vacunación, por tanto, alertan sobre la necesidad de actualizar los linajes de la vacuna. Además, a través de los análisis filogenéticos se detecta la introducción de variantes virales con potencial pandémico en la población humana. Uno de los objetivos de este estudio fue caracterizar filogenéticamente las variantes de los virus influenza A y B que circularon en Cuba entre los años 2006 y 2010.

IV.1.1 Virus influenza A(H3N2) estacional.

Se obtuvieron 22 secuencias nucleotídicas del virus influenza A(H3N2) que circuló en Cuba durante el período 2006-2010. El análisis filogenético demostró que las variantes que circularon

en Cuba evolucionaron siguiendo el patrón típico de los virus estacionales (Figura IV.1).

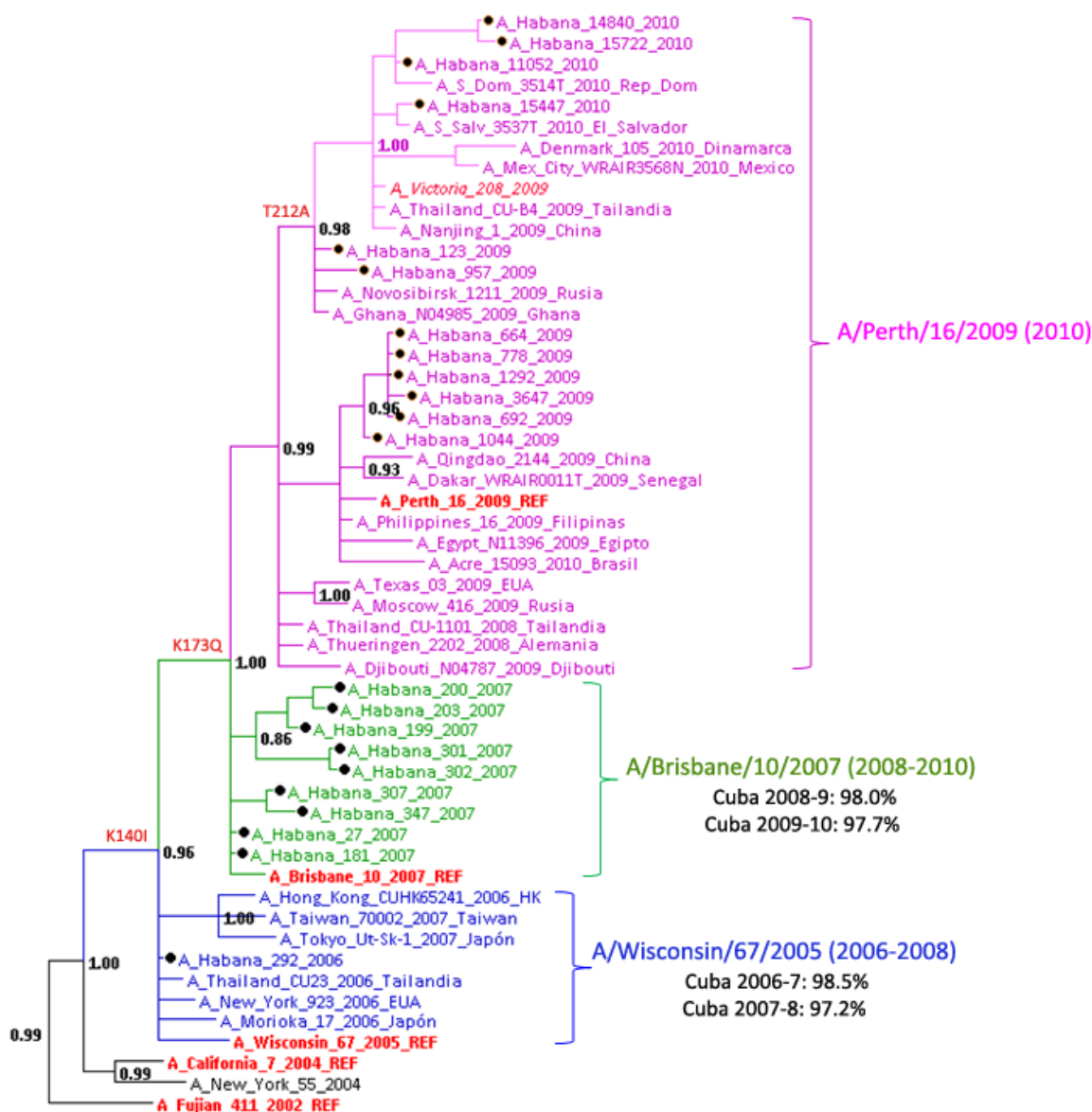


Figura IV.1. Relaciones filogenéticas de los virus influenza A(H3N2). En los nodos aparecen los valores de BPP $\geq$ 0.85. Círculos negros: secuencias obtenidas en este estudio. Secuencias en rojo (REF): cepas de referencia o linajes de la vacuna. Cada grupo definido por los linajes de la vacuna anti-influenza tiene un color que lo identifica. A la derecha de las llaves: nombre de los linajes; entre paréntesis: años en que se incluyeron en las vacunas; debajo: porcentajes de similitud aminoacídica de las secuencias de Cuba respecto a la de referencia. Las mutaciones que aparecen en los nodos definieron la evolución de un linaje a otro.

Este patrón se caracteriza por la formación de grupos no aleatorios donde uno reemplaza a otro en un período de dos a cinco años, definidos por cambios aminoacídicos en los sitios antigénicos (Figura IV.1) (169). Además, todos los virus detectados en Cuba en el período de estudio se ubicaron en los grupos representados por los linajes incluidos en la vacuna anti-influenza de las diferentes temporadas, apoyados por valores de BPP superiores a 0.95 (Figura IV.1).

Durante el período de estudio, la OMS actualizó la cepa del virus influenza A(H3N2) de la vacuna anti-influenza en dos ocasiones. En el año 2008 el linaje Brisbane/10/2007 reemplazó al linaje Wisconsin/67/2005 (170), presentando seis mutaciones dominantes (G50E, D122N, S138A, K140I, V186G e I223V) donde fue decisivo el cambio K140I localizado en el sitio antigénico A. En el año 2010 el linaje Brisbane/10/2007 fue reemplazado por el linaje Perth/16/2009 (171) y entre las mutaciones detectadas (E62K, N144K, K158N, K173Q y N189K), la K173Q ubicada en el sitio antigénico E fue determinante. Las secuencias obtenidas en este estudio también presentaron estos cambios (Anexo 7). En las secuencias cubanas del año 2010 también se detectó la presencia de la mutación T212A, que a pesar de estar ubicada en el sitio antigénico D solo definió la aparición del sub-linaje Victoria/208/2009. La mutación T212A presente en este sub-linaje no provocó una disminución significativa en su reconocimiento por parte de los anticuerpos generados por el linaje Perth/16/2009 de la vacuna, razón por la cual se mantuvo dentro de este último linaje (172).

Las mutaciones anteriormente descritas, propiciaron la evolución de los virus influenza y determinaron la aparición de linajes diferentes, hecho que también se pudo constatar al analizar los porcentajes de similitud aminoacídica. Estos valores disminuyeron de una temporada a la siguiente (Figura IV.1) debido a las constantes derivas antigénicas que experimentan los virus estacionales de la Influenza, como ocurrió en este estudio (11, 173).

IV.1.2 Virus influenza A(H1N1) estacional.

Para el análisis de los virus influenza A(H1N1) estacional que circularon durante el período 2006-2010, se obtuvieron 14 secuencias de la región HA1 de la HA. Los virus influenza A(H1N1) estacionales que circularon en Cuba evolucionaron siguiendo un patrón semejante al

descrito anteriormente por Plotkin y colaboradores para los virus influenza A estacionales (169), y se ubicaron en dos de los grupos definidos por los linajes de las vacunas (Figura IV.2).

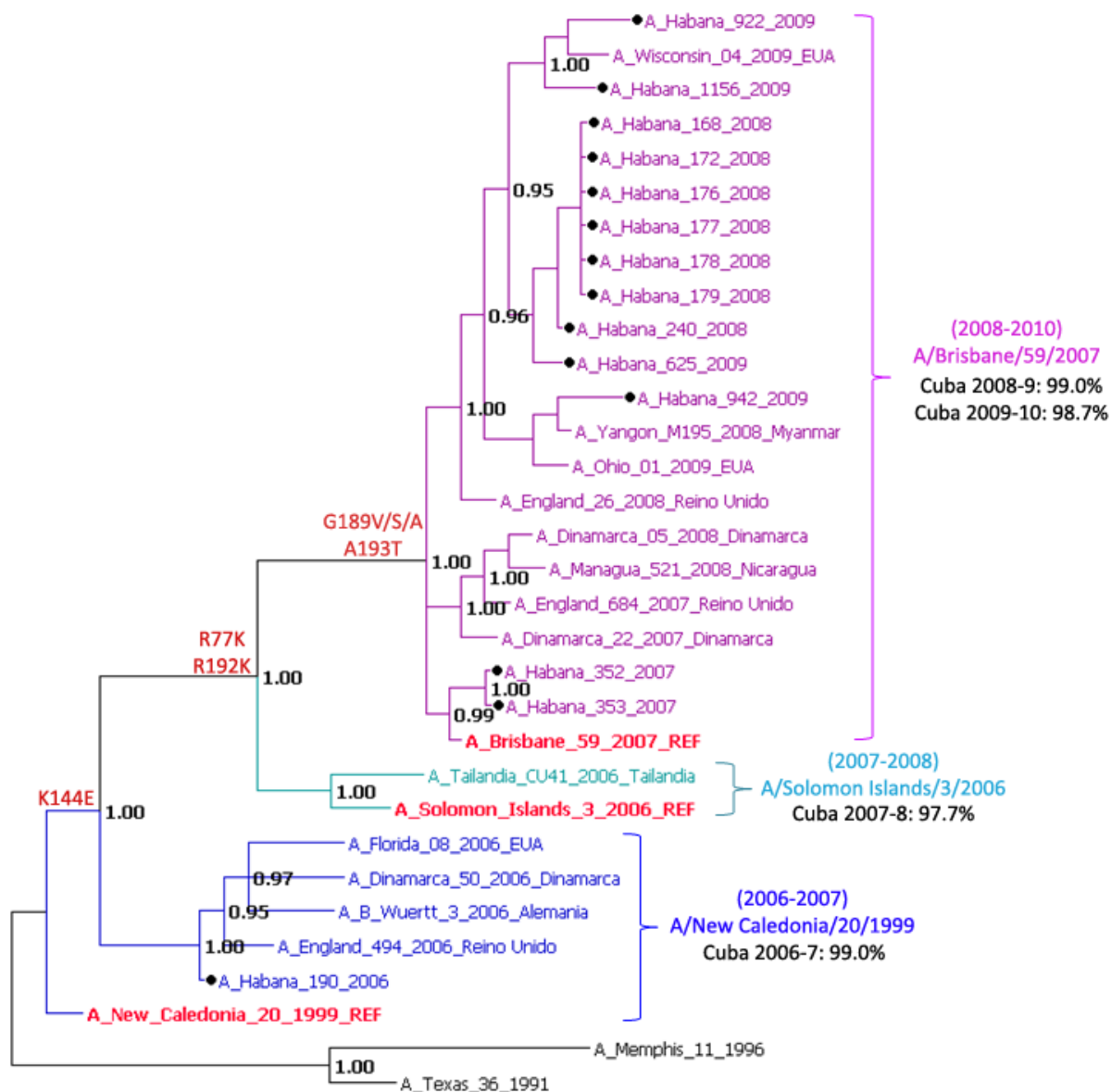


Figura IV.2. Relaciones filogenéticas de los virus influenza A(H1N1) estacionales. En los nodos aparecen los valores de $BPP \geq 0.95$. Círculos negros: secuencias obtenidas en este estudio. Secuencias en rojo (REF): cepas de referencia o linajes de la vacuna. Cada grupo definido por los linajes de la vacuna anti-influenza tiene un color que lo identifica. A la derecha de las llaves: nombre de los linajes; entre paréntesis: años en que se incluyeron en las vacunas; debajo: porcentajes de similitud aminoacídica de las secuencias de Cuba respecto a la de referencia. Las mutaciones que aparecen en los nodos definieron la evolución de un linaje a otro.

Al igual que ocurrió para los virus influenza A(H3N2), los grupos que definieron los linajes se formaron de manera no aleatoria, debido a que un linaje nuevo se originó a partir del anterior en un período de dos a cinco años a través de la ganancia de mutaciones en los sitios antigénicos (deriva antigénica) (174).

En el primer grupo definido por el linaje A/New Caledonia/20/1999 se ubicó la secuencia cubana obtenida a partir de una muestra clínica del año 2006, con un 99% de similitud aminoacídica con la cepa de referencia de este linaje (Figura IV.2). A partir del grupo anterior, se originó el linaje A/Solomon Islands/3/2006, definido por las mutaciones T86K, Y98H, K144E (sitio antigénico Ca), R212K y T270N (Anexo 8) (175). A pesar de compartir un 97,7% de similitud entre sus secuencias de aminoácidos, ninguna de las secuencias cubanas de la temporada 2007-8 perteneció al linaje A/Solomon Islands/3/2006 que constituyó uno de los componentes de la vacuna para ese período (Figura IV.2). Este hallazgo también fue notificado en un estudio realizado en Kenya en igual período de tiempo (176). En otro estudio realizado entre los años 2006 y 2010 en la Isla de Córcega se observó un comportamiento similar, explicado por las constantes derivas antigénicas que experimentan estos virus (177). Por otro lado, Mossad y colaboradores al detectar el mismo fenómeno en igual temporada, afirmaron que esa discrepancia entre las cepas circulantes y las de la vacuna, fue la responsable de que la vacuna de la temporada 2007-2008 produjera bajos niveles de protección ($\approx 40\%$) en la población vacunada (178). Finalmente, las secuencias de la temporada 2007-8 obtenidas en este estudio se ubicaron con el linaje A/Brisbane/59/2007, con el que compartieron un 100% de similitud aminoacídica.

A partir del linaje A/Solomon Islands/3/2006 surgió el linaje A/Brisbane/59/2007 con los cambios aminoacídicos D39N, R77K (sitio antigénico Cb), T132V, K149R, R192K (sitio antigénico Sb), R226Q y E277K (Anexo 8) (78). En este nuevo linaje se ubicaron las secuencias cubanas de las temporadas 2008-9 y 2009-10, las que compartieron porcentajes de similitud aminoacídica por encima del 98% con la cepa A/Brisbane/59/2007. Esta cepa es un componente de la vacuna estacional desde el año 2008 hasta el año 2010. También se encontró que las muestras pertenecientes a las temporadas 2008-9 y 2009-10 formaron un subgrupo definido por mutaciones en las posiciones 189 y 193 (G189V/S/A y A193T), ambas localizadas en el sitio

antigénico Sb (Figura IV.2). Este subgrupo también fue notificado en otros países como Kenya (176) y Tailandia (179).

En general, los virus influenza A(H1N1) estacional detectados en Cuba experimentaron la mayor cantidad de mutaciones localizadas en el sitio antigénico Sb. Al parecer, por su estructura este sitio antigénico está sometido a una presión selectiva del sistema inmune mucho mayor respecto a los otros. Esto podría traer como consecuencia derivas antigénicas que permiten al virus evadir la respuesta inmune (180).

IV.1.3 Virus influenza B estacional.

Para el análisis de los virus influenza B que circularon en Cuba entre los años 2006 y 2010, se obtuvieron 23 secuencias nucleotídicas de la región HA1 de la HA. En la figura IV.3 se observa la definición de dos grupos genéticos fundamentales descritos con anterioridad en la circulación de los virus influenza B, el linaje B/Victoria/87 y el linaje B/Yamagata/88 (181).

Al analizar las secuencias de los virus pertenecientes a la temporada 2006-7 se observó que se agruparon con la cepa de referencia incluida en la vacuna para esa temporada (B/Malaysia/2506/2004), compartiendo un porcentaje de similitud aminoacídica del 99% (Figura IV.3). Este grupo de secuencias se caracterizó por presentar las mutaciones K48E y K80R, y la K129N localizada en el sitio antigénico definido como lazo120 (Anexo 9), descritas en la cepa de la vacuna con anterioridad (182).

El análisis filogenético reveló que en la temporada 2007-8 circularon en Cuba los linajes B/Victoria/87 y B/Yamagata/88 (Figura IV.3). La secuencia cubana perteneciente al linaje B/Yamagata/88 se agrupó con la cepa B/Wisconsin/01/2010 y se definió por las mutaciones N150I y N165Y, localizadas en los sitios antigénicos lazo 150 y lazo 160 respectivamente (Anexo 10). Este hallazgo coincidió con estudios previos realizados por Barr y colaboradores (78). Sin embargo, la cepa de influenza B incluida en la vacuna de la temporada 2007-2008 para el hemisferio Norte fue B/Malaysia/2506/2004 perteneciente al linaje B/Victoria/88. Por tanto, los porcentajes de similitud aminoacídica fueron del 85.5%. La secuencia cubana de la temporada

2007-8 perteneciente al linaje B/Victoria/87 compartió un 97,6% de similitud aminoacídica con el linaje de la vacuna para esa temporada B/Malaysia/2506/2004.

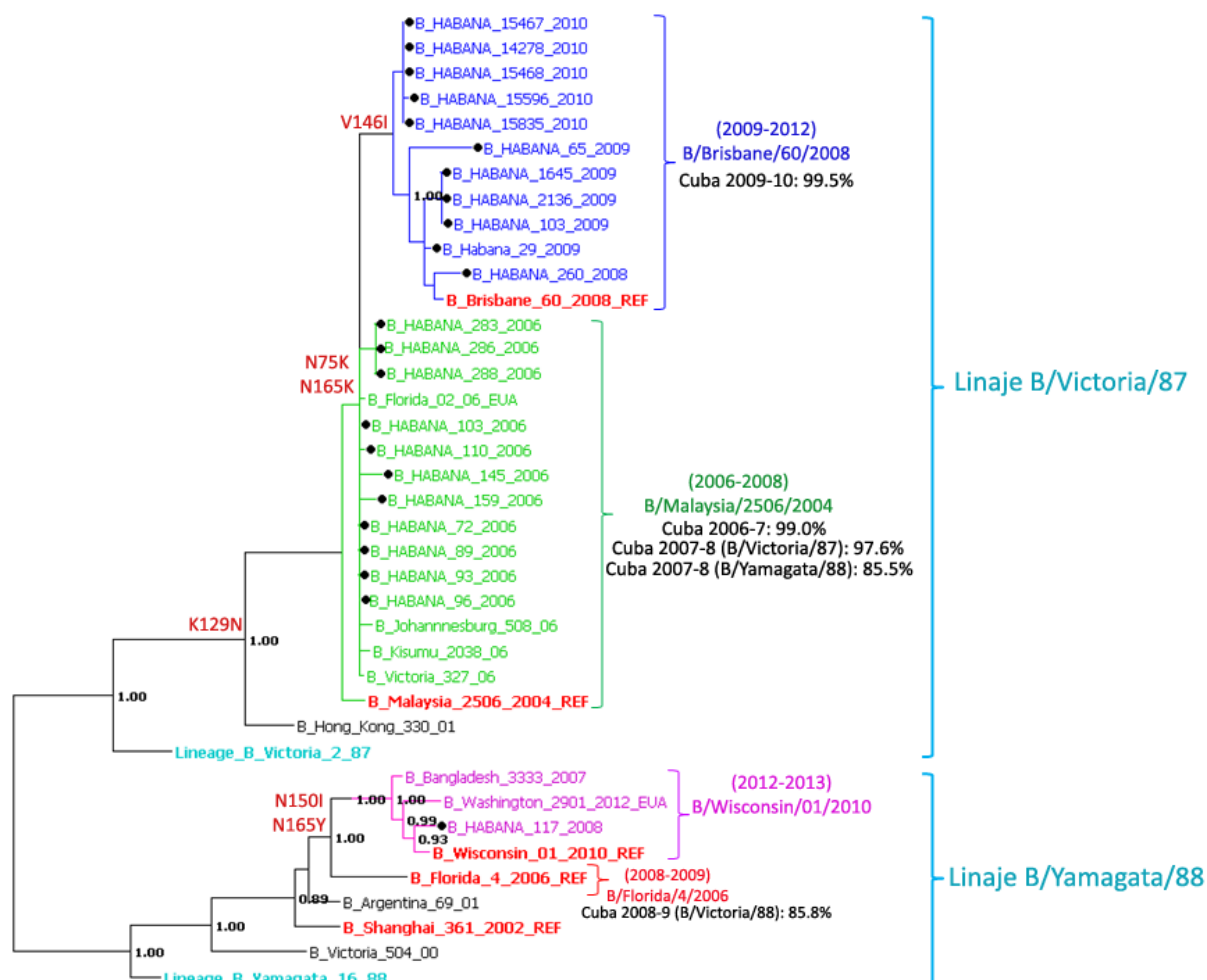


Figura IV.3. Relaciones filogenéticas de los virus influenza B. En los nodos aparecen los valores de BPP $\geq$ 0.85. Círculos negros: secuencias obtenidas en este estudio. Secuencias en rojo (REF): cepas de referencia o linajes de la vacuna. Cada grupo definido por las cepas de la vacuna anti-influenza tiene un color que lo identifica. A la derecha de las llaves: nombre de los grupos formados por la cepa de la vacuna y de los linajes; entre paréntesis: años en que se incluyeron en las vacunas; debajo: porcentajes de similitud aminoacídica de las secuencias de Cuba respecto a la de referencia. Las mutaciones que aparecen en los nodos definieron la evolución de un linaje a otro.

Aunque la secuencia de Cuba presentó las mutaciones características del linaje B/Malaysia/2506/2004 descritas con anterioridad (182), también se detectó la presencia de las

mutaciones N75K (lazo 120) y N165K (lazo 160) (Anexo 9). Estas últimas mutaciones definieron el surgimiento del linaje vacunal B/Brisbane/60/2008, como fue descrito por Pariani y colaboradores (182).

Las secuencias cubanas de la temporada 2008-9 pertenecieron al linaje B/Victoria/87, sin embargo, para esa temporada la vacuna estacional anti-influenza tuvo en su composición un virus influenza B perteneciente al linaje B/Yamagata/88: influenza B/Florida/4/2006. Por esta razón, el porcentaje de similitud aminoacídica fue del 85.8%. Al igual que en la temporada 2007-8, las mutaciones N75K y N165K se encontraron en los virus influenza B circulantes en Cuba durante la temporada 2008-9 (Anexo 9), lo que los agrupó filogenéticamente con la cepa de referencia B/Brisbane/60/2008 (Figura IV.3).

Al analizar los virus influenza B que circularon en Cuba durante la temporada 2009-2010, se evidenció que se agruparon con la cepa vacunal de la temporada (B/Brisbane/60/2008) perteneciente al linaje B/Victoria/87 (Figura IV.3). Estas compartieron un 99,5% de similitud aminoacídica (Figura IV.3) y al igual que para los virus de las temporadas 2007-2008 y 2008-9 pertenecientes a este linaje, los residuos K75 y K165 fueron determinantes en esta ubicación (Anexo 9).

Al estudiar las características genéticas de los virus influenza B que circularon en Cuba en el período 2006-2010, se hizo evidente que en la mayoría de los casos estas diferían de las cepas que se incluyeron en la vacuna estacional. Esto puede traer como resultado que los niveles de protección generados por la vacunación no sean óptimos. La co-circulación de los linajes B/Victoria/87 y B/Yamagata/88 ocurre desde el año 2000 en todo el mundo, en proporciones variables, en diferentes países o regiones y en diferentes momentos. Por esta razón, la predicción de la prevalencia futura de un linaje sobre otro dificulta las recomendaciones para la composición de la vacuna (78). En respuesta a esto, y debido a que la inmunidad frente a un linaje no confiere inmunidad frente al otro, la formulación tetravalente de las vacunas de influenza constituye una opción en la actualidad (183). Este hecho demuestra la importancia de la caracterización molecular de los virus influenza B como parte de la vigilancia de laboratorio.

IV.1.4 Análisis de las relaciones filogenéticas y las secuencias aminoacídicas de un segmento de la región HA1 del gen de la hemaglutinina de los virus influenza A(H1N1)pdm09.

Durante el período de estudio tuvo lugar la ocurrencia de la primera pandemia de influenza del siglo XXI, causada por el virus influenza A(H1N1)pdm09. Por esta razón, el presente objetivo se centró en la filogenia de estos virus.

Los primeros análisis filogenéticos del virus influenza A(H1N1)pdm09 en el mundo mostraron la definición de siete grupos genéticos a partir de la concatenación de secuencias de los 8 segmentos del virus. Cada uno de esos grupos presentó mutaciones características de genes diferentes (184, 185). El análisis de las relaciones filogenéticas de los virus influenza A(H1N1)pdm09 circulantes en Cuba, reveló que el 79% de los virus estudiados pertenecieron al grupo 7 (Figura IV.4). Se reconoció por otros autores que el grupo genético predominante en la fase pandémica fue el 7. El mismo tiene la mutación S203T como característica distintiva en el sitio antigénico Ca (104, 184, 185).

Otro resultado derivado del análisis filogenético fue la definición de un subgrupo con secuencias pertenecientes al final de la epidemia, dentro del propio grupo 7. Este subgrupo constituido por 13 secuencias, posee la mutación A186T ubicada en el sitio antigénico Sb. Los grupos 1, 3 y 6 quedaron bien definidos en el árbol filogenético, sin embargo, las secuencias cubanas no estuvieron representadas en los mismos. Esta observación nos permite sugerir que probablemente las secuencias cubanas que no se incluyeron en el grupo 7 podrían pertenecer a los restantes grupos (2, 4 y 5) que no quedaron definidos en este análisis. La no definición de estos grupos se debe a que las mutaciones que los caracteriza probablemente están ubicadas en otro gen diferente a la HA, utilizado en este análisis (184, 185).

Aunque las secuencias cubanas compartieron un 98.8% de similitud aminoacídica con la secuencia de la cepa incluida en la vacuna monovalente recomendada por la OMS (A/California/07/2009 H1N1pdm09), se detectó la presencia de un grupo de mutaciones. El cambio más frecuente fue el P83S, y en concordancia con otros autores (184-186) este se detecta en todos los grupos genéticos excepto en el uno.

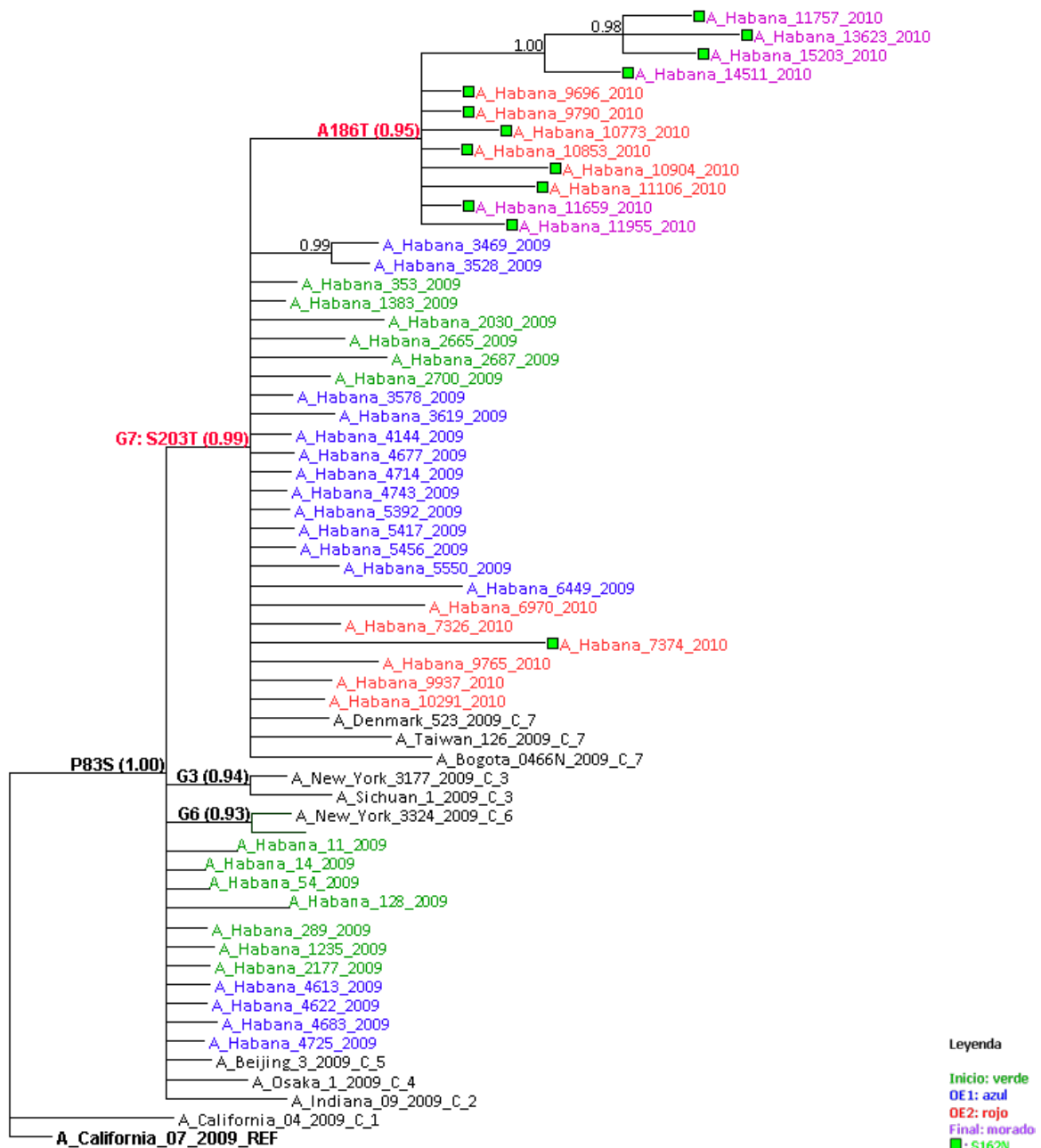


Figura IV.4. Relaciones filogenéticas de los virus influenza A(H1N1)pdm09. Las letras de diferentes colores indican el momento de la fase pandémica en que fue colectada la muestra y los cuadros en verde denotan las secuencias que presentan un sitio de N-glicosilación en el residuo 162 (ver leyenda parte inferior a la derecha). En los nodos aparecen los valores de BPP y con una G los grupos genéticos definidos en este análisis junto a las mutaciones que los caracteriza.

Sin embargo, cinco de los cambios aminoacídicos estuvieron ubicados en sitios antigénicos: S203T y D222E (sitio antigénico Ca); N156K y S162N (sitio antigénico Sa); A186T (sitio antigénico Sb). La frecuencia de ocurrencia de estos cambios se muestra en la figura IV.5.

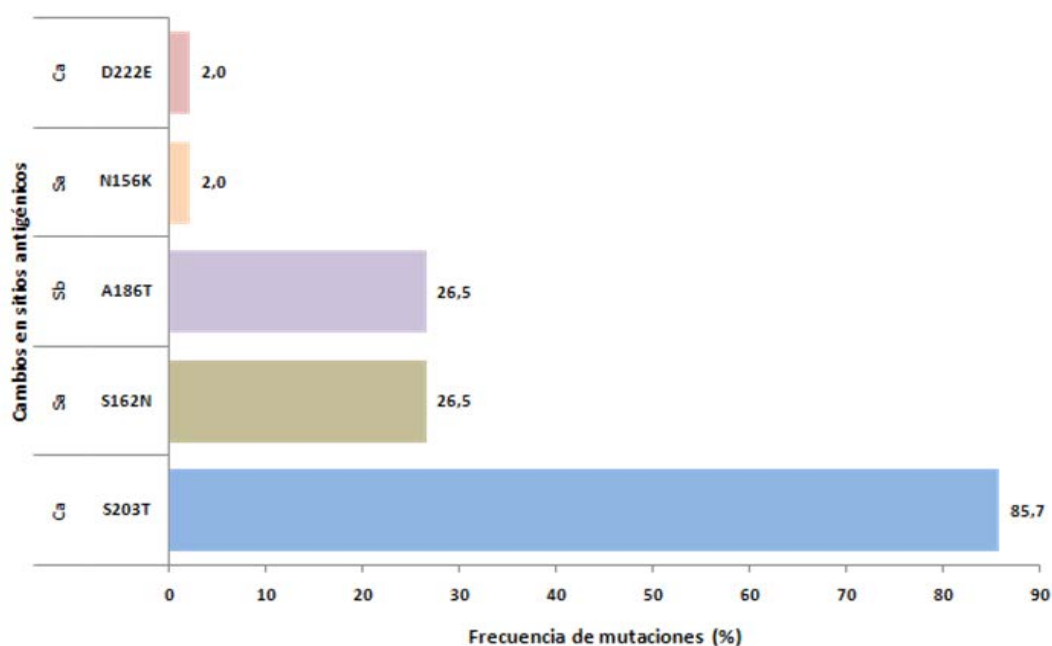


Figura IV.5. Frecuencia de detección de mutaciones en los sitios antigénicos de la HA de los virus influenza A(H1N1)pdm09 en Cuba.

Como fue descrito previamente, la mutación S203T está presente en las muestras pertenecientes al grupo 7. Esta mutación está ubicada en el dominio de unión al receptor de la hemaglutinina, sitio conocido como el determinante principal de especificidad de hospedero de los virus influenza A. De forma interesante, esta mutación apareció de forma transitoria en las secuencias de las HA de los virus H1N1 humanos aislados en 1934 y en los virus H1N1 porcinos aislados entre 1976 y 1977 (186). Se ha planteado que este cambio aminoacídico puede aumentar la infectividad y transmisibilidad del virus influenza A(H1N1)pdm09 en el humano.

Otra mutación que se detectó en las muestras incluidas en la presente investigación fue la S162N, se encontró en 13 (26.5%) de las secuencias pertenecientes a las muestras colectadas a finales del año 2010. Esta mutación, además de estar ubicada en el sitio antigénico Sa, constituye un punto de N-glicosilación. La región Sa está localizada en la parte superior de la cabeza de la

hemaglutinina, aquí las posiciones 125, 127, 155, 160 y 162 constituyen sitios de N-glicosilación. Por otro lado, se conoce que los glicanos adicionados en los sitios de glicosilación 125 y 160, pueden bloquear de manera efectiva la unión de los anticuerpos dirigidos contra las cepas pandémicas de los años 1918 y 2009 (187). Además, Shisheng y colaboradores en el año 2011 (125) establecieron que los glicanos adicionados en las posiciones 127, 155 y 162 podrían tener la misma función. Sin embargo, la glicosilación de los sitios 125 y 160 protege el sitio antigénico Sa con mayor efectividad, pues se ubican en el mismo centro, mientras que los sitios 155 y 162 se ubican en el borde del mismo (125).

La importancia de detectar sitios de glicosilación es que la adición de oligosacáridos repercute en la evolución de los sitios antigénicos. Aunque se plantea que la glicosilación tiene un efecto neto ligero sobre el dominio globular en cuanto a variación, esta se focaliza en los epítopes antigénicos desprotegidos, apoyando la idea de que la glicosilación es una estrategia efectiva para desviar los anticuerpos neutralizantes (188-190).

La mutación A186T que también se detectó en este estudio, se localizó en el sitio Sb en el 26.5% de las secuencias cubanas. Como se pudo observar en la figura IV.4, esta mutación definió un subgrupo dentro del grupo 7, conformado por secuencias de finales del año 2010. Esta mutación aparece de forma combinada con la S162N en 12 de las secuencias cubanas, lo que coincide con el estudio publicado por Houn y colaboradores en el año 2011 (191). Por otro lado, en los EUA y en Ecuador se detectó la emergencia de un subgrupo de virus influenza A(H1N1)pdm09, con la combinación de las mutaciones N31D, I272V, S162N y A186T, donde las dos últimas pueden modular la unión de los anticuerpos (192).

Otros investigadores canadienses también encontraron la mutación A186T en el estudio publicado en el año 2011, y plantearon además que este sitio está ubicado dentro del sitio de unión al receptor, específicamente, en la hélice 190 (193). Por su parte, Piralla y colaboradores (194) asociaron este cambio con la forma severa de la enfermedad. Este hallazgo no ocurrió en este estudio, pues solo 4 de las 13 secuencias cubanas con la mutación A186T fueron de pacientes que padecieron la forma severa de la enfermedad producida por el virus influenza A(H1N1)pdm09.

La mutación N156K, ubicada en el sitio antigénico Sa, también se detectó en una de las secuencias cubanas. Strengell y colaboradores hallaron esta mutación en combinación con la N125D en una muestra. Estos autores demostraron la asociación de estas mutaciones de forma independiente o combinada con la disminución en el reconocimiento por parte de los anticuerpos producidos por la cepa de la vacuna A/California/07/2009, en individuos vacunados (195).

Una de las secuencias cubanas obtenida a partir del ENF de un paciente que padeció una ETI, portó la mutación D222E ubicada en el sitio antigénico Ca, coincidiendo con otros reportes de la literatura (196, 197). El aminoácido ubicado en las posiciones 190 y 222 de la HA del virus pandémico del año 1918 determinó la especificidad de receptor, debido a que las mutaciones en estas posiciones causaron un cambio en la afinidad de enlace $\alpha 2,6$ -AS a $\alpha 2,3$ -AS. Esto trajo como resultado una disminución de la eficiencia de transmisión del virus. Sin embargo, el cambio de ácido aspártico por glicina en la posición 222 (D222G) puede hacer que el virus tenga doble especificidad de unión al receptor, tanto para $\alpha 2,6$ -AS como para $\alpha 2,3$ -AS. De esta forma, se plantea que el virus puede llegar a causar una infección del tracto respiratorio inferior, incrementando la severidad de la enfermedad (198, 199). En el caso del virus influenza A(H1N1)pdm09 la mutación D222G se asoció con una probabilidad mayor de desarrollar la forma severa de la enfermedad (196, 200, 201), sin embargo, un reporte de la OMS desestimó esta teoría, al menos por el momento, a través de experimentos realizados en hurones (197). Al igual que en el presente estudio, en otras regiones como Noruega (196), España (198), y Hong Kong (202), no encontraron asociación entre la mutación D222E y la severidad de la enfermedad, por lo que concluyeron que no confiere ninguna ventaja evolutiva al virus.

Igarashi y colaboradores, formularon que en los sitios antigénicos de los virus influenza A(H1N1)pdm09 pudieran ocurrir una serie de mutaciones basados en modelos matemáticos (203). De los cambios predichos por ellos, en el presente estudio se detectó el S162N y el D222E, sin embargo, en la posición 222 solo se predijo el cambio D/G y no el D/E. Otros cambios detectados en los sitios antigénicos de las secuencias cubanas, no predichos por el estudio de Igarashi fueron: S203T, A186T y N156K. Este resultado demostró la necesidad de continuar profundizando en los estudios evolutivos de los virus influenza en los humanos.

Otra mutación de interés detectada en dos de las secuencias cubanas fue la N276Y, aunque no se encuentra ubicada en un sitio antigénico constituye la pérdida de un sitio de N-glicosilación. De forma interesante, una de las secuencias que portaba la mutación se obtuvo a partir de la muestra de pulmón de un paciente fallecido que tenía como factor de riesgo la obesidad; mientras que la otra provenía de un ENF de una gestante que evolucionó satisfactoriamente. La HA de los virus pandémicos del año 2009 tienen un sitio de glicosilación en la posición 276 (N276, con la secuencia NTT), el cual no se había identificado previamente en los virus influenza A(H1N1) estacionales, aunque sí se habían detectado sitios de glicosilación en la vecindad de esta región (204). Wang y su equipo de investigadores demostraron que el hecho de ganar o perder el sitio de glicosilación en la posición 276, no contribuyó a la pérdida de la infectividad ni la antigenicidad (205).

El análisis de los resultados presentados permitió determinar que los virus influenza A(H1N1)pdm09 circulantes en Cuba durante todo el período pandémico fueron similares a la cepa vacunal A/California/07/2009, mientras que la mayoría se incluyó en el grupo genético 7 que predominó a nivel mundial. Los cambios aminoacídicos reportados en este estudio fueron similares a los encontrados por otros autores, algunos de ellos incluidos en sitios antigénicos de importancia. Algunas de las secuencias cubanas ganaron sitios de N-glicosilación mientras otras los perdieron, siendo este uno de los mecanismos que permite al virus influenza permanecer circulando en las poblaciones humanas. No obstante, habría que definir por estudios *in vitro* la significación de dichas mutaciones en la replicación del virus. Todo lo anteriormente expuesto, demostró la necesidad de mantener una vigilancia estricta desde el punto de vista molecular sobre los virus influenza A(H1N1)pdm09.

IV.2 Determinar la relación de los niveles de expresión del ARN de IL-1 β , IL-8, RANTES y el TLR-2 y la presencia del CCR5 Δ 32, con la forma severa de la enfermedad producida por el virus influenza A(H1N1)pdm09 en abril-diciembre/2009.

Desde el inicio de la pandemia del año 2009 se reconoció que los virus influenza A(H1N1)pdm09 eran capaces de producir una infección del TRB, en contraste con los virus influenza estacionales que típicamente afectan el TRS (206). Los primeros análisis de las secuencias de aminoácidos de las proteínas HA, PB2, NS1 y PB1-F2 de los virus influenza A(H1N1)pdm09, demostraron la no

existencia de marcadores moleculares asociados a una virulencia elevada (14, 15). Este hallazgo mantiene abierta la interrogante sobre los posibles mecanismos que expliquen la virulencia elevada de los virus influenza A(H1N1)pdm09 en comparación con los virus estacionales. Algunos estudios actuales se han dirigido hacia la identificación de factores del hospedero que resulten críticos para una replicación viral eficiente (207), mientras que otros lo han hecho hacia los niveles de citocinas/quimioquinas producidos en el hospedero durante la infección con el virus influenza A(H1N1)pdm09 (208).

Durante la pandemia causada por el virus influenza A(H1N1)pdm09, entre abril y diciembre del año 2009 en Cuba se detectó un incremento inusual de las IRAGs (67,2%) y los fallecimientos (71.8%) producidos por el virus influenza A(H1N1)pdm09 en pacientes de edad comprendida hasta los 55 años, cifras obtenidas del Registro de Datos del LNRI. El presente objetivo estuvo centrado en establecer la relación de algunos determinantes de la respuesta inmune con la severidad de la enfermedad producida por los virus influenza A(H1N1)pdm09.

En la figura IV.6 se presentaron los niveles de expresión del ARN de IL-1 β , IL-8, RANTES y el TLR-2 en los grupos definidos como ETI, IRAG y fallecidos, conformados por individuos de hasta 55 años de edad diagnosticados con infección por el virus influenza A(H1N1)pdm09, confirmado por el laboratorio. En ninguno de los gráficos se mostraron los valores de los controles negativos utilizados como calibradores debido a que, por definición, su valor de cuantificación relativa es igual a uno con el método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (162).

Se detectaron diferencias significativas en los niveles de expresión del ARN de IL-1 β entre el grupo definido como ETI y los grupos definidos como IRAG y fallecidos (Figura IV.6). La explicación de este comportamiento pudiera estar relacionada con el tiempo de colecta de la muestra (espacio de tiempo transcurrido entre la fecha de inicio de los síntomas y la fecha de colecta de la muestra). Se conoce que la IL-1 β se produce en las primeras horas durante la infección con el virus influenza (209), y que en el presente estudio el tiempo promedio de colecta de la muestra del grupo ETI fue de 1 día, 4 días para el grupo IRAG, y 6 días para el grupo de fallecidos (Registro de Datos del LNRI). Estos hechos apoyan los resultados obtenidos en este análisis.

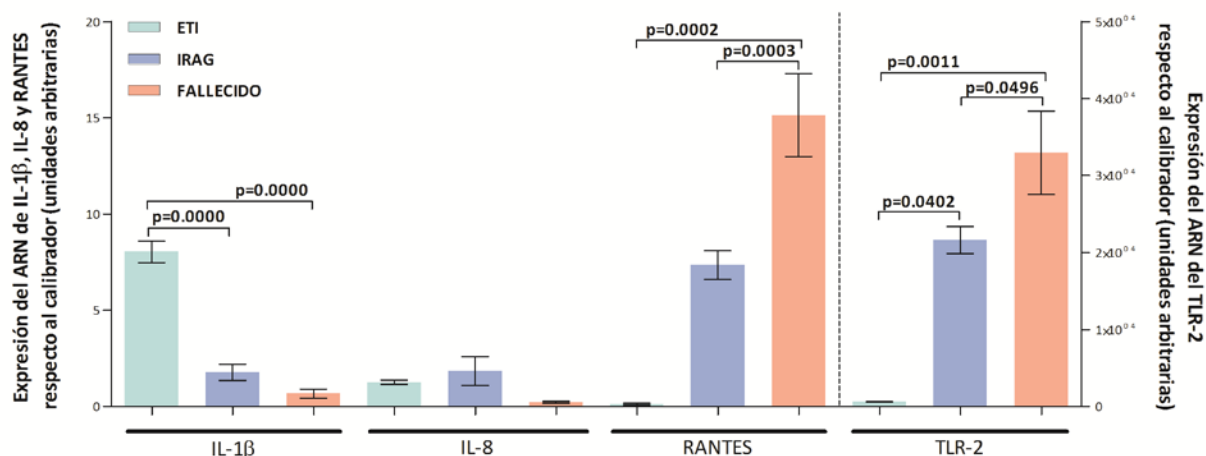


Figura IV.6. Niveles de expresión del ARN de IL-1 β , IL-8, RANTES, y el TLR-2 en las 76 muestras positivas al virus influenza A(H1N1)pdm09 incluidas en el estudio. ETI=enfermedad tipo influenza, IRAG=infección respiratoria aguda grave. Solo se mostraron los valores de $p < 0.05$. Las barras de error representan la desviación estándar de la media de los valores de expresión del ARN.

Los niveles de detección del ARN de IL-8 no mostraron diferencias significativas entre los tres grupos en estudio. Una vez más el tiempo de la colecta de la muestra constituyó la posible explicación. Aunque la IL-8 se produce inmediatamente después que la IL-1 β (209), es probable que aún no alcanzara su máxima expresión en el grupo de pacientes ETI. Sin embargo, para los grupos IRAG y fallecidos, lo más probable es que estas citocinas cumplieron su función pro-inflamatoria, y por un mecanismo de retroalimentación negativa comienzan a disminuir sus niveles, actuando desde ese momento otros componentes de la respuesta inmune (210).

Los niveles de expresión del ARN de RANTES fueron significativamente diferentes entre el grupo de fallecidos y los grupos ETI e IRAG (Figura IV.6). Aunque la diferencia entre los grupos ETI e IRAG no fue significativa ($p=0.093$), es importante resaltar que en el grupo IRAG los niveles de ARN de RANTES se expresaron 7.3 veces más respecto al calibrador interno, en contraste con el grupo ETI que solo fue de 0.11 veces más. Previamente Thomas y colaboradores demostraron que al estimular las células del TRB con IL-1 β , estas se volvieron más activas en términos de secreción de RANTES. Esto provocó la atracción de las células T y los monocitos, resultando en un infiltrado inflamatorio localizado dominado por estos tipos celulares (211). Por esta razón, una explicación a las diferencias encontradas en la expresión del ARN de RANTES

en la presente investigación, radicó en que las células epiteliales del TRS y TRB se diferencian en cuanto al tipo de quimiocinas que producen después de ser estimuladas o infectadas, lo cual determina la naturaleza de la respuesta inflamatoria y la defensa del hospedero.

Los niveles de expresión del ARN del TLR-2 mostraron diferencias significativas entre los tres grupos estudiados (Figura IV.6). Varios estudios demostraron que la apoptosis puede producirse a través de la participación de los TLR (212, 213). La inmunidad innata desencadenada por la acción de los patógenos, involucra a la respuesta inflamatoria y a la apoptosis de las células infectadas como vías para prevenir la diseminación viral a través de todo el organismo. El TLR-2 fue el primer miembro de esta familia de receptores que se describió con la capacidad de inducir la muerte celular. Se planteó que este mecanismo ocurre mediante la producción de especies reactivas del oxígeno, la activación de la caspasa 3 que ejecuta el programa de apoptosis, y la fosforilación sostenida de MAPKp38 que activa al NFkB y AP-1, incrementando la muerte celular (212). Todos esos mecanismos de forma desregulada contribuyen al daño tisular, lo que pudiera llevar al órgano que están afectando a la pérdida de la integridad y de sus funciones. Los resultados obtenidos en el presente trabajo respecto a los niveles de expresión del ARN del TLR-2, son consistentes con los hallazgos realizados por otros autores discutidos previamente, teniendo en cuenta que los niveles mayores de expresión fueron detectados en los grupos de pacientes IRAG y fallecidos.

IV.2.1 Polimorfismo del gen ccr5 en pacientes infectados con el virus influenza A(H1N1)pdm09.

En investigaciones realizadas por otros autores, se estableció que la presencia del CCR5Δ32 (ausencia del CCR5 funcional) se asoció con la protección frente a las cepas M-trópicas del VIH 1, mientras que por otro lado, se asoció a la severidad de la enfermedad producida por los flavivirus, el VNO (167, 214) y el virus influenza A(H1N1)pdm09 (215). Teniendo en cuenta estos antecedentes, nuestra próxima tarea se centró en determinar la condición del CCR5 y su relación con la fatalidad en individuos infectados con el virus influenza A(H1N1)pdm09.

Solo se detectó la variante heterocigótica de la delección 32 (58% de los fallecidos y 21% de los no fallecidos) (Tabla IV.1). De forma interesante, se encontró una asociación estadísticamente

significativa entre la presencia de la delección 32 y la fatalidad ($p=0.0013$). Este resultado sugiere que la inmunodeficiencia generada por la expresión del receptor mutado, tiene un impacto significativo en la mortalidad relacionada a la infección por el virus pandémico. Este efecto negativo de la delección 32 sobre la evolución de la enfermedad, fue observado en otras enfermedades virales, por ejemplo, existen evidencias que apoyan la asociación de la delección delta 32 a la severidad de la infección por los flavivirus (88). Además, existen reportes en la literatura que relacionan el efecto del CCR5 Δ 32 con la severidad de la enfermedad producida por los virus influenza (215-218).

Tabla IV.1. Relación entre la fatalidad en pacientes diagnosticados con el virus influenza A(H1N1)pdm09 y la presencia de la delección 32 del CCR5 ($\chi^2=10.28$; $p=0.0013$).

	CCR5+/-	CCR5+/+
Fallecido (n=24)	14	10
No fallecido (n=52)	11	41

Leyenda: CCR5+/+ (homocigótico salvaje); CCR5+/- (heterocigótico para la delección)

Kohlmeier y colaboradores retaron con el virus influenza ratones de fenotipo salvaje para el CCR5 y ratones deficientes para este receptor. Demostraron que el CCR5 participó en el direccionamiento de los linfocitos TCD8⁺ al sitio de infección y que su ausencia se asoció con un incremento de la mortalidad (216). Esto, unido a que el CCR5 constituye una característica fenotípica de las células Th1, sugiere que la deficiencia del CCR5 influye de forma negativa en el proceso de eliminación viral y de parásitos intracelulares de forma general (219). Los hallazgos anteriores realizados por otros autores, pueden explicar la asociación significativa entre la presencia de la delección 32 del CCR5 y la fatalidad en individuos cubanos infectados por el virus el virus influenza A(H1N1)pdm09.

Otros investigadores demostraron que la interacción entre RANTES y el CCR5 establece señales antiapoptóticas para la supervivencia de los macrófagos durante la infección viral (119), por lo que la deficiencia del CCR5 pudiera ser un factor de riesgo de origen genético asociado al incremento de la severidad de la enfermedad producida por el virus influenza A(H1N1)pdm09. En la figura IV.7, se representó la variación en los niveles de expresión del ARN de RANTES en presencia o ausencia de la delección 32 del CCR5.

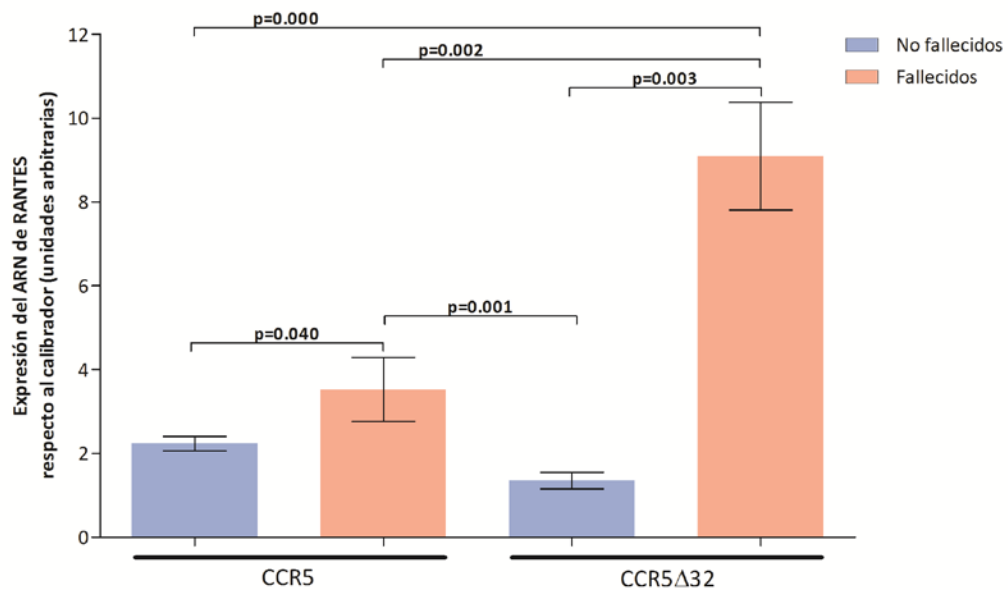


Figura IV.7: Niveles de expresión del ARN de RANTES: fallecidos/CCR5=10; fallecidos/CCR5Δ32=14; no fallecidos/CCR5=41; fallecidos/CCR5Δ32=11. Solo se mostraron los valores de $p < 0.05$. Las barras de error representan la desviación estándar de la media de los valores de expresión del ARN.

Se observaron diferencias significativas en la expresión del ARN de RANTES entre las muestras de fallecidos/CCR5Δ32 y las de los no fallecidos/CCR5, no fallecidos/CCR5Δ32 y fallecidos/CCR5. Estas diferencias pueden explicarse teniendo en cuenta los hallazgos de Amiram y colaboradores, ellos plantearon que los neutrófilos y las células T activadas en estado de apoptosis que expresan el CCR5, secuestran y eliminan a RANTES de los sitios de inflamación, actuando como terminadores de las señales de quimiocinas durante la resolución de la inflamación (220). Aplicando este conocimiento al presente estudio, los portadores de la delección 32 del CCR5 presentan una capacidad reducida de eliminar RANTES y otras quimiocinas de los sitios de infección, afectando el inicio de la fase de resolución de la inflamación y causando más daño en los tejidos y órganos, con un desenlace fatal para el paciente.

También se observaron diferencias significativas en los niveles de expresión del ARN de RANTES entre los fallecidos/CCR5 y los no fallecidos/CCR5Δ32 (Figura IV.7). Este resultado parecería contradictorio, si tenemos en cuenta el análisis realizado hasta ahora. Sin embargo, es

necesario recordar que la mutación solamente se detectó en su forma heterocigótica, es decir, aunque en densidades bajas, hay expresión del CCR5. Por esta razón, el desenlace fatal de la enfermedad pudo estar determinado además, por la acción de otros factores individuales (embarazo, obesidad, proceso oncológico, EPOC, inmunosupresión, infección bacteriana secundaria, entre otros) (221). Además, dentro del grupo no fallecidos/CCR5Δ32 (integrado por 11 muestras), hay 2 muestras pertenecientes al grupo ETI, las cuales expresaron niveles bajos del ARN de RANTES respecto al grupo IRAG (Figura IV.6), lo que definitivamente pudo influir disminuyendo los niveles de expresión general de este grupo.

Por otro lado, los niveles de expresión del ARN de RANTES también se diferenciaron de forma significativa entre los fallecidos/CCR5 y los no fallecidos/CCR5 (Figura IV.7). Este comportamiento puede ser explicado por la tormenta de citocinas, definida como una respuesta inmune excesiva y no controlada ante la infección, con una liberación masiva de citocinas pro-inflamatorias y quimo atrayentes en los pulmones, dentro de las cuales encontramos a RANTES (222).

Haciendo un análisis más profundo, se conoce que la interacción CCR5-RANTES es esencial para inhibir la apoptosis de las células infectadas por el virus (incluyendo a los macrófagos), sin embargo, la apoptosis de las células infectadas es imprescindible en la defensa del hospedero. Esta aparente paradoja, tiene su explicación en la función crucial que tienen los macrófagos infectados en oponer resistencia a la muerte celular y además, eliminar las células infectadas y apoptóticas del tejido. Si este proceso de eliminación se interrumpe por la apoptosis de los macrófagos debido a una deficiencia en la interacción CCR5-RANTES, no se eliminan los patógenos ni las células residuales apoptóticas, causando un daño adicional al tejido (119). Por lo tanto, se puede inferir que la expresión deficiente del CCR5 detectada en el presente trabajo posiblemente afectó la interacción RANTES-CCR5, produciendo un efecto negativo sobre la eliminación eficiente de las células infectadas y las células apoptóticas, con un posible desenlace fatal.

Los resultados obtenidos en este acápite, permitieron esclarecer la función de algunos elementos del sistema inmune y del hospedero, en el desenlace de la enfermedad producida por el virus

influenza A(H1N1)pdm09. Sin embargo, es necesario aclarar que una limitante de esta investigación lo constituye la comparación establecida entre muestras provenientes de diferentes localizaciones anatómicas, donde el sistema inmune tiene sus propias particularidades (211). Aun así, al igual que en este estudio, otros autores presentaron evidencias de que los niveles elevados de RANTES, junto a otras quimiocinas como MCP-1 e IP-10, están directamente correlacionados con la severidad de la enfermedad y la mortalidad producida por los virus influenza (87, 90, 223).

IV.3 Identificar la circulación de variantes de los virus influenza resistentes a los bloqueadores del canal M2 y a los inhibidores de la neuraminidasa en el período de estudio.

Es evidente, que la genética del hospedero y la respuesta inmune frente a una cepa nueva de virus influenza, constituyen factores que pueden determinar incrementos en los niveles de mortalidad en las poblaciones. También es cierto que los nuevos conocimientos acumulados en este campo ofrecen nuevas dianas para evitar las complicaciones durante la infección con variantes emergentes de los virus influenza. Sin embargo, las vacunas y las drogas antivirales constituyen la primera línea de defensa frente a estos virus, ocupando los antivirales un lugar preponderante durante los eventos pandémicos. A pesar de esto, durante la evolución de los virus emergen variantes resistentes a las drogas antivirales en uso, por lo que es de vital importancia mantener una vigilancia estricta para detectar a tiempo el surgimiento de variantes virales resistentes y mantener actualizadas las guías de tratamiento y prevención (224).

IV.3.1 Detección de marcadores moleculares de resistencia a los bloqueadores del canal M2 en los virus influenza A circulantes en Cuba.

En la actualidad se conoce que un cambio aminoacídico en cualquiera de los cinco residuos del dominio de transmembrana de esta proteína (L26F, V27A, A30T, S31N, G34E) confiere resistencia cruzada a la amantadina y rimantadina (225). El análisis de las secuencias aminoacídicas cubanas reveló la presencia de la mutación S31N en la proteína M2 del 100% de los virus influenza A(H3N2) estudiados (Figura IV.8a). Por otro lado, no se observó ninguno de los marcadores moleculares de resistencia a los adamantanos en el caso de las secuencias obtenidas para los virus influenza A(H1N1) estacional.

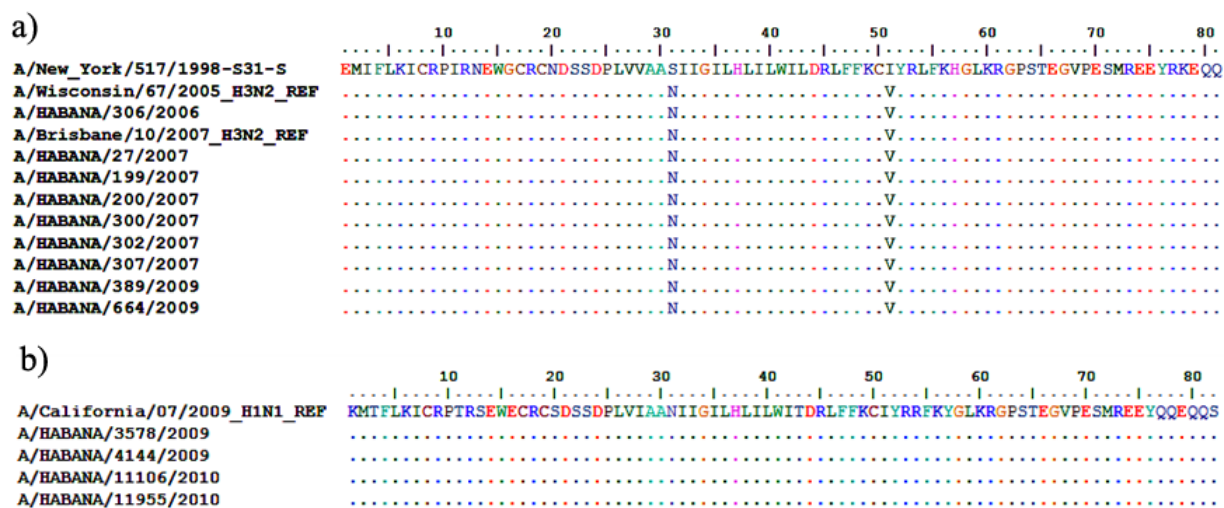


Figura IV.8. Alineamiento comparativo de las secuencias de aminoácidos de la proteína M2 de los virus influenza A obtenidas a partir de muestras de pacientes cubanos: a) virus influenza A(H3N2) estacionales y b) virus influenza A(H1N1)pdm09.

Estos resultados coinciden con otros estudios, donde el 100% de las cepas resistentes a los adamantanos pertenecieron a los virus influenza A(H3N2), y el mismo porcentaje de cepas sensibles fue encontrado en los virus influenza A(H1N1) estacional (226, 227). Sin embargo, al realizar un análisis con secuencias de varias regiones del mundo, Deyde y colaboradores revelaron la presencia del 96% de cepas resistentes para los virus influenza A(H3N2) y del 15% para el caso de los virus influenza A(H1N1) estacional (145). En Cuba no se detectaron variantes resistentes a los adamantanos en los virus influenza A(H1N1) a diferencia de otras regiones del mundo aunque con una frecuencia baja (145). En nuestra opinión, esta situación podría deberse a varias razones: la mayoría de las variantes resistentes fueron detectadas en países asiáticos, la sensibilidad de los métodos utilizados para la detección de las variantes resistentes, la cantidad de muestras analizadas, entre otras.

En el presente estudio se incluyeron muestras a partir del año 2006, lo que apoyó el hecho de que el 100% de los virus influenza A(H3N2) estudiados a partir de ese año en Cuba resultaran resistentes a los adamantanos. Esta afirmación se fundamenta en el incremento que se produjo entre los años 2001-2005 y que alcanzó un nivel máximo en el año 2006 en varios países (145, 228). Este comportamiento se debe a que las variantes resistentes surgen de forma muy rápida en un paciente bajo tratamiento y que se transmiten fácilmente (145).

Durante el período de tiempo analizado, también circuló el virus pandémico influenza A(H1N1)pdm09. El nuevo virus pandémico comenzó a ser detectado desde abril/2009 co-circulando con los virus influenza A(H3N2), A(H1N1) estacional e influenza B. Posteriormente se convirtió en el virus predominante y desplazó totalmente de la circulación al virus A(H1N1) estacional (19). El 100% de las secuencias cubanas de la proteína M2 del virus influenza A(H1N1)pdm09 resultó ser resistente a los adamantanos al detectarse la sustitución S31N (Figura IV.8b), demostrando que los virus influenza A(H1N1)pdm09 eran resistentes a los adamantanos. Los resultados obtenidos en este trabajo para el virus pandémico están en concordancia con otros artículos que señalaron que estos virus son resistentes a los bloqueadores del canal iónico M2 desde su detección por primera vez en la población humana (184, 229, 230).

Los resultados del presente estudio demostraron por primera vez en Cuba la importancia de llevar a cabo la vigilancia de la circulación de las variantes resistentes a los adamantanos. El hecho de que un virus pandémico resistente a los inhibidores de este tipo de antiviral haya desplazado de la circulación a uno sensible, marcó pautas en el tratamiento, decidiéndose el uso de los INAs disponibles previo a la obtención de una vacuna contra el virus pandémico. El hecho de mantener esta vigilancia también permite la correcta toma de decisiones en cuanto a políticas de tratamiento se refiere y permite trazar nuevas estrategias terapéuticas y para el diseño de nuevos compuestos antivirales contra la influenza.

IV.3.2 Detección de marcadores moleculares de resistencia a los inhibidores de la neuraminidasa en los virus influenza A y B circulantes en Cuba.

Los virus influenza A y B eran susceptibles al oseltamivir a nivel mundial desde su disponibilidad en el año 1999, excepto en raras excepciones. Durante la temporada 2008-2009 se produjo un incremento significativo en los niveles de resistencia al oseltamivir en los virus influenza A(H1N1) estacionales a nivel mundial, debido a la presencia de la mutación H275Y en la NA (231).

En Cuba, aunque se tiene constancia del uso de los adamantanos en el control de brotes (232) las drogas antivirales no se empleaban con frecuencia. Esto se debió probablemente a los precios y disponibilidad de los antivirales en el mercado, y a que la vacunación anti-influenza en los grupos

de riesgo constituía una práctica común (233). Aunque el oseltamivir se introdujo por primera vez en la práctica clínica en el año 1999 (234), en Cuba esto no sucedió hasta el año 2009 durante el curso de la pandemia causada por el virus influenza A(H1N1)pdm09.

Según los resultados obtenidos en el presente estudio, durante los años 2006-2007 no se evidenció la circulación de cepas de virus influenza con marcadores moleculares de resistencia al oseltamivir. Sin embargo, en el año 2008, el 100% de los virus influenza A(H1N1) estacional presentaron la mutación H275Y (Figura IV.9), cambio principal relacionado con la resistencia a este inhibidor de la NA. Este comportamiento fue semejante al informado por Gubareva y colaboradores en el año 2008 quienes detectaron este mismo patrón de resistencia al oseltamivir (235). Los resultados publicados por otros países revelaron que durante el año 2008, los niveles de resistencia alcanzaron valores entre el 95% y el 100% (236-238), semejante a los obtenidos en la presente investigación.

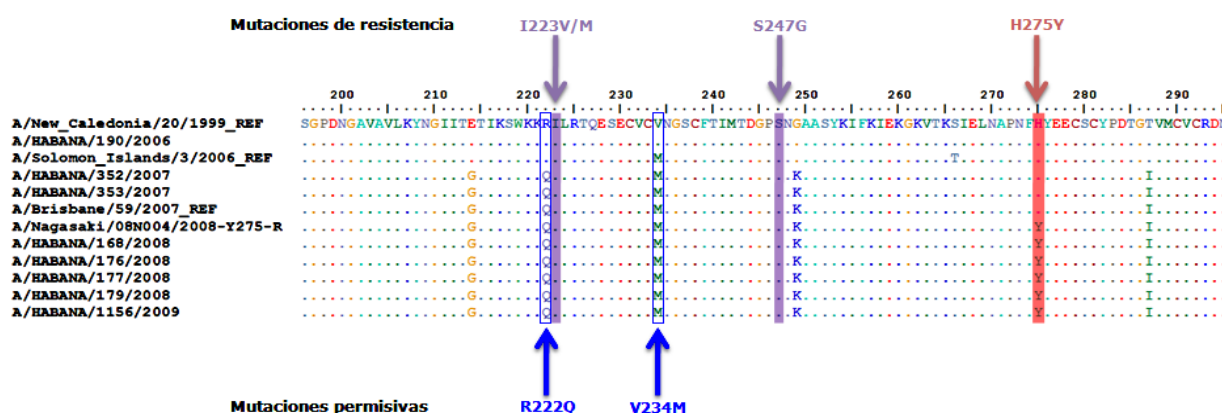


Figura IV.9. Alineamiento comparativo de las secuencias de aminoácidos de la proteína NA de los virus influenza A(H1N1) estacionales obtenidas a partir de muestras de pacientes cubanos.

Aunque la resistencia al oseltamivir surge fundamentalmente en pacientes inmunocomprometidos bajo tratamiento con la droga antiviral, el incremento en los niveles de resistencia a los INAs no se asoció a la presión global del uso del oseltamivir (239). Este planteamiento se sustentó en el hecho de que países como Japón que utilizaron el antiviral con frecuencia elevada los niveles de resistencia solo alcanzaron el 2.6% (240), mientras que en Noruega el antiviral se empleó con baja frecuencia y los niveles de resistencia alcanzaron el 67.6% (241). Estos hallazgos apoyan la detección en Cuba de variantes de los virus influenza A(H1N1) estacionales resistentes al

oseltamivir durante el año 2008, antes de la introducción de esta droga antiviral al país en el año 2009. Aún quedaría la interrogante de cuál o cuáles factores determinaron la circulación y el predominio de estas variantes resistentes, en un período en que el tratamiento con oseltamivir no estaba incluido en la práctica clínica.

En este sentido, antes de la temporada 2007-2008, los virus influenza A(H1N1) estacionales con la mutación H275Y en la NA no se fijaron en la circulación, probablemente debido a una tasa de transmisión baja. Sin embargo, un análisis de la fijación de los virus tipo-A/Brisbane/59/2007 que circularon durante la temporada 2007-2008, reveló que habían recuperado su fijación y transmisibilidad (148). Posteriormente se determinó que las mutaciones permisivas V234M y R222Q originadas previamente a la mutación H275Y en la NA, posibilitaron la estabilidad del balance entre las funciones antagónicas de la HA y la NA, contribuyendo a la fijación del virus en la población (242). Durante el análisis de las secuencias cubanas se detectó la presencia de estas mutaciones a partir del año 2007 sin la presencia de la H275Y, sin embargo, para el año 2008 las cepas contenían las mutaciones permisivas y adicionalmente la H275Y (Figura IV.9).

En el presente estudio, no se encontraron variantes resistentes al oseltamivir en los virus influenza A(H3N2), influenza B e influenza A(H1N1)pdm09. También es importante señalar, que en las secuencias cubanas del virus pandémico del año 2009 no se detectaron las mutaciones permisivas de la NA. Este hallazgo coincide con lo reportado por Memoli y colaboradores, quienes publicaron la no detección de estas mutaciones en los virus influenza A(H1N1)pdm09, sugiriendo además que probablemente este virus no las necesite para mantener su estabilidad, incrementando el riesgo de la emergencia de resistencia (243).

Kaverin y colaboradores demostraron que tanto los cambios en la HA como en la NA pueden determinar la sensibilidad natural a los INAs (244), probablemente debido a una alteración en el balance entre las funciones antagonistas de estas dos glicoproteínas (94). Se ha sugerido que las mutaciones T155A, V223I, R229I, K222T, S186F y S165I en la proteína HA, disminuyen su afinidad por el ácido siálico. Esta observación realizada a partir de estudios *in vitro*, determinó la liberación de las partículas virales de forma menos dependiente de la actividad de la NA (231). Por otro lado, Mishin y colaboradores encontraron el mismo efecto mediante la glicosilación de

la proteína hemaglutinina en el residuo N162 (245). Ambos efectos proporcionan al virus un mecanismo compensatorio ante la pérdida de actividad de la NA, funcionando como un mecanismo de resistencia a este tipo de droga antiviral.

El análisis de las secuencias cubanas de la HA de los virus influenza A(H1N1)pdm09 reveló la presencia del residuo N162 en 13 de ellas, todas detectadas entre los meses de enero y agosto del año 2010. A través del análisis en el servidor NetNGlyc 1.0 se determinó a este residuo como un sitio potencial de N-glicosilación, y con ello una menor dependencia de la actividad de la NA (Figura IV.10). Estas variantes virales tendrían la capacidad de multiplicarse aún en presencia de los INAs.

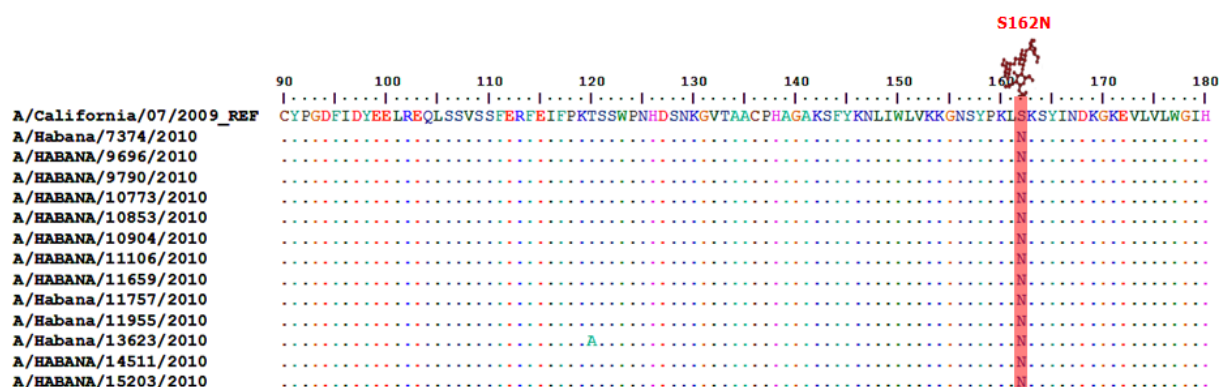


Figura IV.10. Alineamiento comparativo de las secuencias de aminoácidos de la proteína HA de los virus influenza A(H1N1)pdm09, mostrando la ganancia de un sitio de N-glicosilación en el residuo aminoacídico 162.

Los resultados presentados en esta investigación, contribuyeron al primer reporte de la circulación en Cuba de variantes resistentes a los bloqueadores del canal M2 y a los inhibidores de la neuraminidasa de los virus influenza.



Capítulo V
DISCUSIÓN INTEGRADA

V. DISCUSIÓN INTEGRADA

La capacidad que tienen los virus influenza de adaptarse a varios hospederos y de experimentar eventos de reordenamiento genético, asegura la generación constante de cepas nuevas con niveles impredecibles de patogenicidad, transmisibilidad y potencial pandémico (10). Esta es la razón fundamental por la cual los virus influenza causan epidemias estacionales de forma recurrente y pandemias globales de forma ocasional en la población humana. Con el objetivo de disminuir las complicaciones durante la infección por este agente infeccioso, la vacunación se ha convertido en una práctica común. La clave del éxito para que un programa de vacunación anti-influenza sea efectivo radica en la selección correcta de las cepas de la vacuna. Sin embargo, la presión selectiva que establece el sistema inmune sobre el virus induce variaciones genéticas que dan origen a cepas antigénicamente nuevas. Por esta razón, un panel de expertos de la OMS revisa el contenido de la vacuna cada temporada para los hemisferios Norte y Sur (11).

Los resultados obtenidos en la presente investigación aportaron datos sobre la primera caracterización genética de los virus influenza circulantes en Cuba, resultando también de gran interés para la región debido a la escasa información sobre las características de estos virus en las zonas tropicales y subtropicales (246, 247). Algunas variantes de los virus influenza A y B detectadas en Cuba fueron análogas a los linajes incluidos en las vacunas, y presentaron las mutaciones que definieron cada linaje. Sin embargo, otras variantes, particularmente de los virus influenza A(H1N1) estacional y los virus influenza B no siguieron ese comportamiento. La información derivada de este análisis constituye una alerta sobre la posible ineficacia de la vacuna, sustentada en la falta de analogía entre las cepas circulantes y las incluidas en la vacuna. Esta alerta cobra mayor importancia para los grupos de riesgo y permite a tiempo el cambio de estrategia de tratamiento con el uso de drogas antivirales como alternativa.

Otro hallazgo importante fue la detección por primera vez del linaje B/Yamaga/88 de los virus influenza B en Cuba. Este hecho también tuvo repercusiones sobre la vacunación en su formulación trivalente, debido a que en una misma temporada circularon los dos linajes de los virus influenza B, por lo que la población vacunada quedó desprotegida contra uno de ellos. Aquí la recomendación inmediata es el uso de las drogas antivirales, priorizando los grupos de riesgo y controlando la diseminación de los brotes (248). Otra recomendación pudiera ser la administración de la vacuna tetravalente, la cual incluye los dos linajes de los virus influenza B (183).

Dentro del período seleccionado los virus influenza A(H1N1)pdm09 protagonizaron la primera pandemia de influenza del siglo XXI (249). La vigilancia molecular durante el período inter-pandémico permitió detectar la introducción de esta variante nueva en la población cubana. Los resultados del análisis molecular demostraron que el grupo genético 7 predominó entre los virus influenza A(H1N1)pdm09 circulantes en Cuba, comportamiento similar a otras regiones del mundo. Las mutaciones detectadas fueron similares a las de otras investigaciones, en cambio se detectó la variante D222E en lugar de la D222G asociada a la severidad de la enfermedad por algunos autores. Este hallazgo, demostró la necesidad de mantener una estricta vigilancia sobre la futura evolución del virus, con el objetivo de poder detectar a tiempo algún cambio relacionado al incremento en su virulencia. La analogía genética entre los virus circulantes y la cepa del virus incluida en la vacuna, resultó un indicativo importante en la reducción del impacto de la pandemia sobre los grupos de riesgo y la población en general.

Durante las epidemias estacionales, los niveles de morbilidad y mortalidad son más pronunciados en los niños pequeños que no se han expuesto previamente al virus, así como en los adultos mayores de 65 años de edad con una función inmunológica deprimida (5). La enfermedad causada por los virus influenza puede ser leve, localizada en el TRS y autolimitada. Sin embargo, en algunas ocasiones la enfermedad progresa a una neumonía primaria o secundaria que puede traer como consecuencias el fallo múltiple de órganos, fallo respiratorio, síndrome de distrés respiratorio agudo, y en algunas ocasiones la muerte (4). En las pandemias la morbilidad y la mortalidad alcanzan niveles devastadores en el grupo de adultos jóvenes, hecho al que se han dedicado numerosos estudios sin llegar a un consenso con los resultados obtenidos (7). Existen

evidencias que proponen la participación de factores virales, del hospedero y ambientales sobre la severidad de la enfermedad causada por los virus influenza (8-10).

La pandemia producida por el virus influenza A(H1N1)pdm09, en Cuba al igual que en otras regiones del mundo, se calificó de leve a moderada por su impacto. Sin embargo, entre los meses de abril a diciembre del año 2009 se produjo un incremento en las notificaciones de las IRAG y los casos fatales, con un predominio de las personas de 55 años o menos. El presente estudio permitió determinar la relación de los niveles de expresión del ARN de IL-1 β , IL-8, RANTES y el TLR-2, y la presencia del CCR5 Δ 32 con la severidad de la enfermedad producida por los virus influenza A(H1N1)pdm09 en Cuba. Los resultados obtenidos demostraron que RANTES y el TLR-2 contribuyeron significativamente al incremento de la severidad del cuadro clínico producido por el virus pandémico. Otro hallazgo de interés fue que se encontró una relación significativa entre la delección 32 del CCR5 y el fallecimiento de personas con diagnóstico positivo a influenza A(H1N1)pdm09. Estos resultados apoyan las características multifacéticas y complejas de la inmunidad frente a los virus influenza, la cual involucra diferentes armas de la respuesta inmune, y que al parecer todas son requeridas para lograr la eliminación del virus de forma eficiente. La exacerbación de algunos de los elementos de la respuesta inmune demostrada en este trabajo, puede traer consigo un daño inmunopatológico severo y la muerte. Los resultados aquí expuestos y los obtenidos por otros grupos de investigadores, ofrecen posibles dianas para futuras intervenciones terapéuticas. Sin embargo, constituye un gran reto realizar estas intervenciones con elevado grado de precisión para equilibrar los efectos positivos y negativos del sistema inmune. La profundización en este tipo de estudio, también permitirá establecer marcadores genéticos del hospedero como indicadores de alto riesgo para el desarrollo de la forma severa de la enfermedad producida por los virus influenza. Todo esto permitirá ampliar el espectro de intervenciones sobre la interacción virus-hospedero, con el objetivo de disminuir las complicaciones de la enfermedad.

A pesar de los avances del conocimiento del hombre acerca de los virus influenza, las tasas de morbilidad y mortalidad producidas por este agente infeccioso tienen un considerable impacto negativo a nivel mundial (250). El uso de las drogas antivirales durante la infección con los virus influenza constituye la intervención primaria para el tratamiento y la profilaxis post-exposición.

Sin embargo, la emergencia de la resistencia a los bloqueadores del canal M2 dejó obsoleto el uso de este tipo de droga antiviral, mientras que por otro lado emergen variantes resistentes a los INAs. Este panorama hace más compleja la toma de decisiones para el tratamiento y la profilaxis de esta enfermedad (12). La presente investigación aportó los primeros resultados sobre los patrones de resistencia frente a las drogas antivirales anti-influenza en Cuba. El hallazgo más significativo fue la detección de patrones moleculares de resistencia a los bloqueadores del canal M2 y a los inhibidores de la neuraminidasa. El 100% de los virus influenza A(H3N2) y A(H1N1)pdm09 analizados resultaron resistentes a los bloqueadores del canal M2, mientras permanecieron sensibles a los INAs. Estos resultados son de gran importancia para los clínicos, pues les permite elegir certeramente la droga antiviral para el tratamiento. Por otro lado, las autoridades del Ministerio de Salud Pública cuentan con la información necesaria para trazar adecuadamente las estrategias de tratamiento y prevención durante los brotes y epidemias. Ante la no disponibilidad de vacunas y la resistencia a los bloqueadores del canal M2 de los virus influenza A(H1N1)pdm09, los resultados obtenidos permitieron elegir con seguridad a los INAs como terapia alternativa. Esta intervención fue clave en la prevención de las complicaciones de los grupos de riesgo y en el control de los brotes durante la pandemia del año 2009. Por otro lado, los virus influenza A(H1N1) estacionales resultaron sensibles a los adamantanos, mientras que la resistencia al oseltamivir emergió a partir del año 2008, después de la aparición de mutaciones permisivas desde el año 2007. Las mutaciones permisivas fueron las responsables de la diseminación de la variante resistente al oseltamivir de los virus influenza A(H1N1) estacional en todo el mundo. Afortunadamente, estos virus fueron desplazados de la circulación estacional, por lo que todos los virus influenza que circulan en el humano en la actualidad son sensibles al oseltamivir, con algunas excepciones.

Otro resultado del presente trabajo demostró la detección de la mutación S162N en la HA de los virus influenza A(H1N1)pdm09 detectados en el último período de la pandemia en Cuba. El efecto de este cambio es la compensación de la actividad de la neuraminidasa a través de una eficiencia reducida en la unión de la HA a los receptores celulares (245, 251). La importancia de la detección de esta variante es que puede multiplicarse en presencia de los INAs, por lo que se recomendó mantener bajo estricta vigilancia su evolución.

Quedó demostrado que la caracterización de los principales factores (virus, hospedero, ambiente) que determinan el curso de las epidemias y de la propia enfermedad causada por los virus influenza, puede contribuir al incremento de la efectividad de las políticas trazadas para mitigar su efecto devastador. La caracterización genética de los virus influenza permite vigilar el surgimiento de variantes nuevas del virus, estableciendo en tiempo la necesidad de actualizar algún componente de la vacuna o el surgimiento de una cepa con potencial pandémico. Además, a través de este tipo de caracterización es posible la identificación de determinantes de virulencia para un mejor entendimiento de los genotipos relacionados a la patogenicidad y de los factores que contribuyen al origen de las pandemias.

La caracterización de los patrones de resistencia a las drogas antivirales aporta información útil para la toma de decisiones en las políticas de tratamiento. La emergencia de variantes resistentes a las drogas antivirales en uso, apuntan hacia la necesidad urgente de desarrollar tratamientos alternativos contra la influenza, como es el caso del desarrollo de nuevos compuestos antivirales. Las estrategias en desarrollo incluyen mejorar el diseño de las drogas disponibles (ruta de liberación y potencia), la identificación de compuestos que tengan como diana diferentes proteínas virales y la aplicación de terapias combinadas. Alternativamente, numerosos estudios han resaltado la posibilidad de hacer diana sobre las interacciones virus-hospedero y sobre los mecanismos celulares del hospedero para desarrollar nuevas formas de terapia contra la influenza.



Capítulo VI CONCLUSIONES

VI. CONCLUSIONES

- Las relaciones filogenéticas de los virus influenza A y B en Cuba durante el período 2006-2010, demostraron la circulación de diferentes variantes genéticas de estos virus y su agrupación en diferentes linajes.
- Se demostró la circulación de algunas variantes de los virus influenza A(H1N1) estacional e influenza B que fueron genéticamente divergentes respecto a las cepas de la vacuna estacional.
- La caracterización genética de los virus influenza A(H1N1)pdm09 reveló la circulación de variantes con diferentes mutaciones y el predominio del grupo genético 7.
- La sobre expresión de los niveles del TLR-2 y RANTES, y la presencia de la forma heterocigótica del CCR5Δ32 contribuyeron a la severidad de la enfermedad producida por el virus influenza A(H1N1)pdm09.
- Se evidenció la circulación de variantes de virus influenza A(H3N2) y A(H1N1)pdm09 resistentes a los inhibidores del canal M2.
- Las variantes de virus influenza A(H1N1) estacional resistentes a los inhibidores de la NA circularon en Cuba de forma predominante desde el año 2008, después de la ganancia de mutaciones permisivas.
- La mutación compensatoria S162N detectada en la HA de los virus influenza A(H1N1)pdm09, sugiere la posible multiplicación del virus en presencia de los INAs y su diseminación en la población.



Capítulo VII RECOMENDACIONES

VII. RECOMENDACIONES

1. Sistematizar la caracterización genética de los virus influenza e introducir a los análisis otros genes determinantes de la patogenicidad (PB1-F2, PB2, PA y NS1).
2. Introducir otros elementos de la respuesta inmune innata en el análisis de la asociación entre la respuesta inflamatoria y la severidad de la enfermedad producida por los virus influenza.
3. Introducir las pruebas de resistencia *in vitro* a las drogas antivirales anti-influenza.



Capítulo VIII
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bouvier NM, Palese P. The biology of influenza viruses. *Vaccine*. 2008 Sep 12;26 Suppl 4:D49-53.
2. Hilleman MR. Realities and enigmas of human viral influenza: pathogenesis, epidemiology and control. *Vaccine*. 2002 Aug 19;20(25-26):3068-87.
3. Lagace-Wiens PR, Rubinstein E, Gumel A. Influenza epidemiology-past, present, and future. *Crit Care Med*. 2009 Dec 19.
4. Neumann G, Kawaoka Y. The first influenza pandemic of the new millennium. *Influenza Other Respi Viruses*. 2011;5:157-66.
5. La Gruta NL, Kedzierska K, Stambas J, Doherty PC. A question of self-preservation: immunopathology in influenza virus infection. *Immunol Cell Biol*. 2007 Feb-Mar;85(2):85-92.
6. Simonsen L, Clarke MJ, Schonberger LB, Arden NH, Cox NJ, Fukuda K. Pandemic versus epidemic influenza mortality: a pattern of changing age distribution. *J Infect Dis*. 1998 Jul;178(1):53-60.
7. Ma J, Dushoff J, Earn DJ. Age-specific mortality risk from pandemic influenza. *J Theor Biol*. 2011;288:29-34.
8. Fukuyama S, Kawaoka Y. The pathogenesis of influenza virus infections: the contributions of virus and host factors. *Curr Opin Immunol*. 2011;23:1-6. doi: 10.1016/j.coi.2011.07.016.
9. Kuiken T, Holmes EC, McCauley J, Rimmelzwaan GF, Williams CS, Grenfell BT. Host species barriers to influenza virus infections. *Science*. 2006 Apr 21;312(5772):394-7.
10. Tscherne DM, García-Sastre A. Virulence determinants of pandemic influenza virus. *J Clin Invest*. 2011;121(1):6-13.
11. Carrat F, Flahault A. Influenza vaccine: the challenge of antigenic drift. *Vaccine*. 2007 Sep 28;25(39-40):6852-62.
12. Clark NM, Lynch JP, 3rd. Influenza: Epidemiology, Clinical Features, Therapy, and Prevention. *Semin Respir Crit Care Med*. 2011;32(4):373-92.
13. Layne SP. Human influenza surveillance: the demand to expand. *Emerg Infect Dis*. 2006 Apr;12(4):562-8.
14. Garten RJ, Davis CT, Russell CA, Shu B, Lindstrom S, Balish A, et al. Antigenic and genetic characteristics of swine-origin 2009 A(H1N1) influenza viruses circulating in humans. *Science*. 2009 Jul 10;325(5937):197-201.

15. Smith GJ, Vijaykrishna D, Bahl J, Lycett SJ, Worobey M, Pybus OG, et al. Origins and evolutionary genomics of the 2009 swine-origin H1N1 influenza A epidemic. *Nature*. 2009 Jun 25;459(7250):1122-5.
16. To KK, Hung IF, Li IW, Lee KL, Koo CK, Yan WW, et al. Delayed clearance of viral load and marked cytokine activation in severe cases of pandemic H1N1 2009 influenza virus infection. *Clin Infect Dis*. 2010 Mar 15;50(6):850-9.
17. Takeda S, Munakata R, Abe S, Mii S, Suzuki M, Kashiwada T, et al. Hypercytokinemia with 2009 pandemic H1N1 (pH1N1) influenza successfully treated with polymyxin B-immobilized fiber column hemoperfusion. *Intensive Care Med*. 2010 Mar 12.
18. MINSAP. Estadísticas de salud en Cuba. Anuario estadístico 2006.; 2006 [updated 2006; cited]; Available from: <http://bvs.sld.cu/cgi-bin/wxis/anoario/?IsisScript=anoario/iah.xis&tag5001=mostrar^m1461&tag5009=STANDARD&tag5008=10&tag5007=Y&tag5003=anoario&tag5021=e&tag5022=2006&tag5023=1461>.
19. Acosta B, Piñón A, Valdés O, Savón C, Arencibía A, Guilarte E, et al. Rapid Diagnosis of Pandemic (H1N1) 2009 in Cuba. *Emerg Infect Dis*. 2012;18(2):336-7.
20. Palese P, Shaw ML. Orthomyxoviridae: the viruses and their replication. In: Knipe DM, Howley PM, editors. *Fields virology*. Philadelphia: Lippincott Williams &Wilkins; 2007.
21. Tonga S, Lia Y, Rivailierb P, Conrardya C, Alvarez DA, Chenb LM, et al. A distinct lineage of influenza A virus from bats. *PNAS MICROBIOLOGY*. 2011;www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1116200109.
22. Zhu X, Yang H, Guo Z, Yu W, Carney PJ, Li Y, et al. Crystal structures of two subtype N10 neuraminidase-like proteins from bat influenza A viruses reveal a diverged putative active site. *PNAS MICROBIOLOGY*. 2012;109(46):18903-908.
23. Zebedee SL, Lamb RA. Influenza A virus M2 protein: monoclonal antibody restriction of virus growth and detection of M2 in virions. *J Virol*. 1988 Aug;62(8):2762-72.
24. Chen W, Calvo PA, Malide D, Gibbs J, Schubert U, Bacik I, et al. A novel influenza A virus mitochondrial protein that induces cell death. *Nat Med*. 2001 Dec;7(12):1306-12.
25. Hatta M, Kawaoka Y. The NB protein of influenza B virus is not necessary for virus replication in vitro. *J Virol*. 2003 May;77(10):6050-4.
26. Lamb RA, Lai CJ, Choppin PW. Sequences of mRNAs derived from genome RNA segment 7 of influenza virus: colinear and interrupted mRNAs code for overlapping proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1981 Jul;78(7):4170-4.
27. Briedis DJ, Lamb RA, Choppin PW. Sequence of RNA segment 7 of the influenza B virus genome: partial amino acid homology between the membrane proteins (M1) of influenza A and B viruses and conservation of a second open reading frame. *Virology*. 1982 Jan 30;116(2):581-8.

28. Horvath CM, Williams MA, Lamb RA. Eukaryotic coupled translation of tandem cistrons: identification of the influenza B virus BM2 polypeptide. *EMBO J.* 1990 Aug;9(8):2639-47.
29. Dauber B, Heins G, Wolff T. The influenza B virus nonstructural NS1 protein is essential for efficient viral growth and antagonizes beta interferon induction. *J Virol.* 2004 Feb;78(4):1865-72.
30. Garcia-Sastre A. Inhibition of interferon-mediated antiviral responses by influenza A viruses and other negative-strand RNA viruses. *Virology.* 2001 Jan 20;279(2):375-84.
31. Kochs G, Garcia-Sastre A, Martinez-Sobrido L. Multiple anti-interferon actions of the influenza A virus NS1 protein. *J Virol.* 2007 Jul;81(13):7011-21.
32. Briedis DJ, Lamb RA. Influenza B virus genome: sequences and structural organization of RNA segment 8 and the mRNAs coding for the NS1 and NS2 proteins. *J Virol.* 1982 Apr;42(1):186-93.
33. Lamb RA, Choppin PW, Chanock RM, Lai CJ. Mapping of the two overlapping genes for polypeptides NS1 and NS2 on RNA segment 8 of influenza virus genome. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1980 Apr;77(4):1857-61.
34. Couceiro JN, Paulson JC, Baum LG. Influenza virus strains selectively recognize sialyloligosaccharides on human respiratory epithelium; the role of the host cell in selection of hemagglutinin receptor specificity. *Virus Res.* 1993 Aug;29(2):155-65.
35. Matrosovich MN, Matrosovich TY, Gray T, Roberts NA, Klenk HD. Human and avian influenza viruses target different cell types in cultures of human airway epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 Mar 30;101(13):4620-4.
36. Beare AS, Webster RG. Replication of avian influenza viruses in humans. *Arch Virol.* 1991;119(1-2):37-42.
37. Steinhauer DA. Role of hemagglutinin cleavage for the pathogenicity of influenza virus. *Virology.* 1999 May 25;258(1):1-20.
38. Stegmann T. Membrane fusion mechanisms: the influenza hemagglutinin paradigm and its implications for intracellular fusion. *Traffic.* 2000 Aug;1(8):598-604.
39. Pinto LH, Lamb RA. Controlling influenza virus replication by inhibiting its proton channel. *Mol Biosyst.* 2007 Jan;3(1):18-23.
40. Pinto LH, Lamb RA. The M2 proton channels of influenza A and B viruses. *J Biol Chem.* 2006 Apr 7;281(14):8997-9000.
41. Pinto LH, Holsinger LJ, Lamb RA. Influenza virus M2 protein has ion channel activity. *Cell.* 1992 May 1;69(3):517-28.

42. Martin K, Helenius A. Transport of incoming influenza virus nucleocapsids into the nucleus. *J Virol*. 1991 Jan;65(1):232-44.
43. Cros JF, Palese P. Trafficking of viral genomic RNA into and out of the nucleus: influenza, Thogoto and Borna disease viruses. *Virus Res*. 2003 Sep;95(1-2):3-12.
44. Palese P, Shaw ML. Orthomyxoviridae: The Viruses and Their Replication. In: Knipe DM, Howley PM, editors. *Fields Virology*. 5th Edition ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2007. p. 1647-89.
45. Bancroft CT, Parslow TG. Evidence for segment-nonspecific packaging of the influenza A virus genome. *J Virol*. 2002 Jul;76(14):7133-9.
46. Duhaut SD, Dimmock NJ. Defective segment 1 RNAs that interfere with production of infectious influenza A virus require at least 150 nucleotides of 5' sequence: evidence from a plasmid-driven system. *J Gen Virol*. 2002 Feb;83(Pt 2):403-11.
47. Palese P, Compans RW. Inhibition of influenza virus replication in tissue culture by 2-deoxy-2,3-dehydro-N-trifluoroacetylneuraminic acid (FANA): mechanism of action. *J Gen Virol*. 1976 Oct;33(1):159-63.
48. Matrosovich MN, Matrosovich TY, Gray T, Roberts NA, Klenk HD. Neuraminidase is important for the initiation of influenza virus infection in human airway epithelium. *J Virol*. 2004 Nov;78(22):12665-7.
49. Shek LP, Lee BW. Epidemiology and seasonality of respiratory tract virus infections in the tropics. *Paediatr Respir Rev*. 2003;4:105-11.
50. Luk J, Gross P, Thompson WW. Observations on mortality during the 1918 influenza pandemic. *Clin Infect Dis*. 2001 Oct 15;33(8):1375-8.
51. Nguyen-Van-Tam JS, Hampson AW. The epidemiology and clinical impact of pandemic influenza. *Vaccine*. 2003 May 1;21(16):1762-8.
52. Dunn FL. Pandemic influenza in 1957; review of international spread of new Asian strain. *J Am Med Assoc*. 1958 Mar 8;166(10):1140-8.
53. Viboud C, Alonso WJ, Simonsen L. Influenza in tropical regions. *PLoS Med*. 2006 Apr;3(4):e89.
54. Lofgren E, Fefferman NH, Naumov YN, Gorski J, Naumova EN. Influenza seasonality: underlying causes and modeling theories. *J Virol*. 2007 Jun;81(11):5429-36.
55. Monto AS, Kioumehri F. The Tecumseh Study of Respiratory Illness. IX. Occurrence of influenza in the community, 1966--1971. *Am J Epidemiol*. 1975 Dec;102(6):553-63.
56. Chiu SS, Lau YL, Chan KH, Wong WH, Peiris JS. Influenza-related hospitalizations among children in Hong Kong. *N Engl J Med*. 2002 Dec 26;347(26):2097-103.

57. LaForce FM, Nichol KL, Cox NJ. Influenza: virology, epidemiology, disease, and prevention. *Am J Prev Med.* 1994;10 Suppl:31-44.
58. Cannell JJ, Zasloff M, Garland CF, Scragg R, Giovannucci E. On the epidemiology of influenza. *Virol J.* 2008;5:29.
59. Lowen AC, Mubareka S, Tumpey TM, Garcia-Sastre A, Palese P. The guinea pig as a transmission model for human influenza viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006 Jun 27;103(26):9988-92.
60. Simmerman JM, Thawatsupha P, Kingnate D, Fukuda K, Chaising A, Dowell SF. Influenza in Thailand: a case study for middle income countries. *Vaccine.* 2004 Nov 25;23(2):182-7.
61. Chen R, Holmes EC. Avian influenza virus exhibits rapid evolutionary dynamics. *Mol Biol Evol.* 2006 Dec;23(12):2336-41.
62. Glezen WP. Emerging infections: pandemic influenza. *Epidemiol Rev.* 1996;18(1):64-76.
63. Taubenberger JK, Hultin JV, Morens DM. Discovery and characterization of the 1918 pandemic influenza virus in historical context. *Antivir Ther.* 2007;12(4 Pt B):581-91.
64. Morens DM, Taubenberger JK, Fauci AS. The persistent legacy of the 1918 influenza virus. *N Engl J Med.* 2009 Jul 16;361(3):225-9.
65. Johnson NP, Mueller J. Updating the accounts: global mortality of the 1918-1920 "Spanish" influenza pandemic. *Bull Hist Med.* 2002 Spring;76(1):105-15.
66. Rabadan R, Levine AJ, Robins H. Comparison of avian and human influenza A viruses reveals a mutational bias on the viral genomes. *J Virol.* 2006 Dec;80(23):11887-91.
67. Taubenberger JK, Reid AH, Lourens RM, Wang R, Jin G, Fanning TG. Characterization of the 1918 influenza virus polymerase genes. *Nature.* 2005 Oct 6;437(7060):889-93.
68. Smith GJ, Bahl J, Vijaykrishna D, Zhang J, Poon LL, Chen H, et al. Dating the emergence of pandemic influenza viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009 Jul 14;106(28):11709-12.
69. Scholtissek C, Rohde W, Von Hoyningen V, Rott R. On the origin of the human influenza virus subtypes H2N2 and H3N2. *Virology.* 1978 Jun 1;87(1):13-20.
70. Kawaoka Y, Krauss S, Webster RG. Avian-to-human transmission of the PB1 gene of influenza A viruses in the 1957 and 1968 pandemics. *J Virol.* 1989 Nov;63(11):4603-8.
71. Ansart S, Valleron AJ. [The history of viral pandemics]. *Rev Mal Respir.* 2008 Apr;25(4):490-1.
72. Kilbourne ED. Perspectives on pandemics: a research agenda. *J Infect Dis.* 1997 Aug;176 Suppl 1:S29-31.

73. Nakajima K, Desselberger U, Palese P. Recent human influenza A (H1N1) viruses are closely related genetically to strains isolated in 1950. *Nature*. 1978 Jul 27;274(5669):334-9.
74. Dunham EJ, Dugan VG, Kaser EK, Perkins SE, Brown IH, Holmes EC, et al. Different evolutionary trajectories of European avian-like and classical swine H1N1 influenza A viruses. *J Virol*. 2009 Jun;83(11):5485-94.
75. Fouchier RA, Munster V, Wallensten A, Bestebroer TM, Herfst S, Smith D, et al. Characterization of a novel influenza A virus hemagglutinin subtype (H16) obtained from black-headed gulls. *J Virol*. 2005 Mar;79(5):2814-22.
76. Russell RJ, Gamblin SJ, Haire LF, Stevens DJ, Xiao B, Ha Y, et al. H1 and H7 influenza haemagglutinin structures extend a structural classification of haemagglutinin subtypes. *Virology*. 2004 Aug 1;325(2):287-96.
77. Liu S, Ji K, Chen J, Tai D, Jiang W, Hou G, et al. Panorama phylogenetic diversity and distribution of Type A influenza virus. *PLoS One*. 2009;4(3):e5022.
78. Barr IG, McCauley J, Cox N, Daniels R, Engelhardt OG, Fukuda K, et al. Epidemiological, antigenic and genetic characteristics of seasonal influenza A(H1N1), A(H3N2) and B influenza viruses: basis for the WHO recommendation on the composition of influenza vaccines for use in the 2009-2010 Northern Hemisphere season. *Vaccine*. 2009 Feb 3;28(5):1156-67.
79. Yavarian J, Mokhtari-Azad T, Nadji SA, Zeraati H, Naseri M. Analysis of the hemagglutinin and neuraminidase genes of human Influenza A/H3N2 viruses circulating in Iran between 2005 and 2007: antigenic and phylogenetic relationships to vaccine strains. *Intervirology*. 2010;53(2):133-40.
80. Lu YY, Yan JY, Sun CY, Xu CP, Feng Y, Mo SH. [Study on the differences on HA1 regions between epidemic strains and vaccine strains of influenza virus subtype A3 from 1988 to 2005]. *Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi*. 2006 Dec;27(12):1069-72.
81. Savy VL, Baumeister EG, Pontoriero AV. [Antigenic relationship between influenza A (H3N2) strains circulating in Argentina and vaccine strains]. *Medicina (B Aires)*. 1999;59(3):225-30.
82. Wang SF, Lee YM, Chan YJ, Liu HF, Yen YF, Liu WT, et al. Influenza A virus in Taiwan, 1980-2006: Phylogenetic and antigenic characteristics of the hemagglutinin gene. *J Med Virol*. 2009 Aug;81(8):1457-70.
83. Melidou A, Exindari M, Gioula G, Chatzidimitriou D, Pierroutsakos Y, Diza-Mataftsi E. Molecular and phylogenetic analysis and vaccine strain match of human influenza A(H3N2) viruses isolated in Northern Greece between 2004 and 2008. *Virus Res*. 2009 Jul 15.
84. Zepeda-López HM. Inside the outbreak of the 2009 influenza A (H1N1)v virus in Mexico. *PLoS One*. 2010;5:e13256.

85. Shinya K, Ito M, Makino A, Tanaka M, Miyake K, Eisfeld AJ, et al. The TLR4-TRIF pathway protects against H5N1 influenza virus infection. *J Virol*. 2011 Oct 26.
86. Albright FS, Orlando P, Pavia AT, Jackson GG, Cannon Albright LA. Evidence for a heritable predisposition to death due to influenza. *J Infect Dis*. 2008 Jan 1;197(1):18-24.
87. de Jong MD, Simmons CP, Thanh TT, Hien VM, Smith GJ, Chau TN, et al. Fatal outcome of human influenza A (H5N1) is associated with high viral load and hypercytokinemia. *Nat Med*. 2006 Oct;12(10):1203-7.
88. Dawson TC, Beck MA, Kuziel WA, Henderson F, Maeda N. Contrasting effects of CCR5 and CCR2 deficiency in the pulmonary inflammatory response to influenza A virus. *Am J Pathol*. 2000 Jun;156(6):1951-9.
89. Jang H, Boltz D, Sturm-Ramirez K, Shepherd KR, Jiao Y, Webster R, et al. Highly pathogenic H5N1 influenza virus can enter the central nervous system and induce neuroinflammation and neurodegeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Aug 18;106(33):14063-8.
90. Kobasa D, Jones SM, Shinya K, Kash JC, Copps J, Ebihara H, et al. Aberrant innate immune response in lethal infection of macaques with the 1918 influenza virus. *Nature*. 2007 Jan 18;445(7125):319-23.
91. Matrosovich M, Tuzikov A, Bovin N, Gambaryan A, Klimov A, Castrucci MR, et al. Early alterations of the receptor-binding properties of H1, H2, and H3 avian influenza virus hemagglutinins after their introduction into mammals. *J Virol*. 2000 Sep;74(18):8502-12.
92. Stevens J, Corper AL, Basler CF, Taubenberger JK, Palese P, Wilson IA. Structure of the uncleaved human H1 hemagglutinin from the extinct 1918 influenza virus. *Science*. 2004 Mar 19;303(5665):1866-70.
93. Shinya K, Ebina M, Yamada S, Ono M, Kasai N, Kawaoka Y. Avian flu: influenza virus receptors in the human airway. *Nature*. 2006 Mar 23;440(7083):435-6.
94. Wagner R, Matrosovich M, Klenk HD. Functional balance between haemagglutinin and neuraminidase in influenza virus infections. *Rev Med Virol*. 2002 May-Jun;12(3):159-66.
95. Baum LG, Paulson JC. The N2 neuraminidase of human influenza virus has acquired a substrate specificity complementary to the hemagglutinin receptor specificity. *Virology*. 1991 Jan;180(1):10-5.
96. Moscona A. Oseltamivir resistance--disabling our influenza defenses. *N Engl J Med*. 2005 Dec 22;353(25):2633-6.
97. Hatta M, Gao P, Halfmann P, Kawaoka Y. Molecular basis for high virulence of Hong Kong H5N1 influenza A viruses. *Science*. 2001 Sep 7;293(5536):1840-2.

98. Steel J, Lowen AC, Mubareka S, Palese P. Transmission of influenza virus in a mammalian host is increased by PB2 amino acids 627K or 627E/701N. *PLoS Pathog.* 2009 Jan;5(1):e1000252.
99. Gabriel G, Herwig A, Klenk HD. Interaction of polymerase subunit PB2 and NP with importin alpha1 is a determinant of host range of influenza A virus. *PLoS Pathog.* 2008 Feb 8;4(2):e11.
100. Mehle A, Doudna JA. Adaptive strategies of the influenza virus polymerase for replication in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009 Dec 15;106(50):21312-6.
101. McAuley JL, Hornung F, Boyd KL, Smith AM, McKeon R, Bennink J, et al. Expression of the 1918 influenza A virus PB1-F2 enhances the pathogenesis of viral and secondary bacterial pneumonia. *Cell Host Microbe.* 2007 Oct 11;2(4):240-9.
102. Mazur I, Anhlan D, Mitzner D, Wixler L, Schubert U, Ludwig S. The proapoptotic influenza A virus protein PB1-F2 regulates viral polymerase activity by interaction with the PB1 protein. *Cell Microbiol.* 2008 May;10(5):1140-52.
103. Conenello GM, Zamarin D, Perrone LA, Tumpey T, Palese P. A single mutation in the PB1-F2 of H5N1 (HK/97) and 1918 influenza A viruses contributes to increased virulence. *PLoS Pathog.* 2007 Oct 5;3(10):1414-21.
104. Melidou A, Gioula G, Exindari M, Chatzidimitriou D, Diza E, Malisiovas N. Molecular and phylogenetic analysis of the hemagglutinin gene of pandemic influenza H1H1 2009 viruses associated with severe and fatal infections. *Virus Res.* 2010;151:192-99.
105. Hai R, Schmolke M, Varga ZT, Manicassamy B, Wang TT, Belser JA, et al. PB1-F2 expression by the 2009 pandemic H1N1 influenza virus has minimal impact on virulence in animal models. *J Virol.* 2010 Feb 24.
106. Zell R, Krumbholz A, Eitner A, Krieg R, Halbhauer KJ, Wutzler P. Prevalence of PB1-F2 of influenza A viruses. *J Gen Virol.* 2007 Feb;88(Pt 2):536-46.
107. Garcia-Sastre A, Egorov A, Matassov D, Brandt S, Levy DE, Durbin JE, et al. Influenza A virus lacking the NS1 gene replicates in interferon-deficient systems. *Virology.* 1998 Dec 20;252(2):324-30.
108. Hale BG, Randall RE, Ortin J, Jackson D. The multifunctional NS1 protein of influenza A viruses. *J Gen Virol.* 2008 Oct;89(Pt 10):2359-76.
109. Seo SH, Hoffmann E, Webster RG. Lethal H5N1 influenza viruses escape host anti-viral cytokine responses. *Nat Med.* 2002 Sep;8(9):950-4.
110. Jiao P, Tian G, Li Y, Deng G, Jiang Y, Liu C, et al. A single-amino-acid substitution in the NS1 protein changes the pathogenicity of H5N1 avian influenza viruses in mice. *J Virol.* 2008 Feb;82(3):1146-54.

111. Twu KY, Kuo RL, Marklund J, Krug RM. The H5N1 influenza virus NS genes selected after 1998 enhance virus replication in mammalian cells. *J Virol.* 2007 Aug;81(15):8112-21.
112. Obenauer JC, Denson J, Mehta PK, Su X, Mukatira S, Finkelstein DB, et al. Large-scale sequence analysis of avian influenza isolates. *Science.* 2006 Mar 17;311(5767):1576-80.
113. Jackson D, Hossain MJ, Hickman D, Perez DR, Lamb RA. A new influenza virus virulence determinant: the NS1 protein four C-terminal residues modulate pathogenicity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008 Mar 18;105(11):4381-6.
114. Matikainen S, Siren J, Tissari J, Veckman V, Pirhonen J, Severa M, et al. Tumor necrosis factor alpha enhances influenza A virus-induced expression of antiviral cytokines by activating RIG-I gene expression. *J Virol.* 2006 Apr;80(7):3515-22.
115. Wong JP, Christopher ME, Viswanathan S, Karpoff N, Dai X, Das D, et al. Activation of toll-like receptor signaling pathway for protection against influenza virus infection. *Vaccine.* 2009 May 26;27(25-26):3481-3.
116. Loo YM, Gale M, Jr. Influenza: fatal immunity and the 1918 virus. *Nature.* 2007 Jan 18;445(7125):267-8.
117. Guan Y, Poon LL, Cheung CY, Ellis TM, Lim W, Lipatov AS, et al. H5N1 influenza: a protean pandemic threat. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 May 25;101(21):8156-61.
118. Bonville CA, Rosenberg HF, Domachowske JB. Macrophage inflammatory protein-1alpha and RANTES are present in nasal secretions during ongoing upper respiratory tract infection. *Pediatr Allergy Immunol.* 1999;10:39-44.
119. Tyner JW, Uchida O, Kajiwarra N, Kim EY, Patel AC, O'Sullivan MP, et al. CCL5-CCR5 interaction provides antiapoptotic signals for macrophage survival during viral infection. *Nat Med.* 2005;11(11):1180-87.
120. Johnston B, Butcher EC. Chemokines in rapid leukocyte adhesion triggering and migration. *Semin Immunol.* 2002;14:83-92.
121. Mansfield R, Able S, Griffin P, Irvine B, James I. CCR5 Pharmacology Methodologies and Associated Applications. In: Mansfield R, editor. *Methods in Enzymology.* Connecticut: Elsevier Inc; 2009.
122. Muntinghe FLH, Carrero JJ, Gerjan N, Stenvinkel P. TNF- α levels are not increased in inflamed patients carrying the CCR5 deletion 32. *Cytokine.* 2010;53(2011):16-8.
123. Lim JK, Glass WG, McDermot DH, Murphy PM. CCR5: no longer a 'good for nothing' gene – chemokine control of West Nile virus infection. *Trends Immunol.* 2006;27(7):308-12.
124. Keynan Y, Juno J, Meyers A, Blake Ball T, Kumar A, Rubinstein A, et al. Chemokine Receptor 5 Δ 32 Allele in Patients with Severe Pandemic (H1N1) 2009. *Emerg Infect Dis.* 2010;16(10):1621-22.

125. Sun S, Wang Q, Zhao F, Chen W, Li Z. Glycosylation Site Alteration in the Evolution of Influenza A (H1N1) Viruses. *PLoS One*. 2011;6(7):e22844.
126. Vigerust DJ, Shepherd V. Virus glycosylation: role in virulence and immune interactions. *Trends Microbiol*. 2007;15(5):211-17.
127. Cherry JL, Lipman DJ, Nikolskaya A, Wolf YI. Evolutionary dynamics of N-glycosylation sites of influenza virus hemagglutinin. *PLoS Curr Influenza*. 2009:RRN1001.
128. Abe Y, Takashita E, Sugawara K, Matsuzaki Y, Muraki Y, Hongo S. Effect of the addition of oligosaccharides on the biological activities and antigenicity of influenza A/H3N2 virus hemagglutinin. *J Virol*. 2004 Sep;78(18):9605-11.
129. Zhang M, Gaschen B, Blay W, Foley B, Haigwood N, Kuiken C, et al. Tracking global patterns of N-linked glycosylation site variation in highly variable viral glycoproteins: HIV, SIV, and HCV envelopes and influenza hemagglutinin. *Glycobiology*. 2004 Dec;14(12):1229-46.
130. Schulze IT. Effects of glycosylation on the properties and functions of influenza virus hemagglutinin. *J Infect Dis*. 1997 Aug;176 Suppl 1:S24-8.
131. Igarashi M, Ito K, Kida H, Takada A. Genetically destined potentials for N-linked glycosylation of influenza virus hemagglutinin. *Virology*. 2008 Jul 5;376(2):323-9.
132. De Clercq E. Antiviral agents active against influenza A viruses. *Nat Rev Drug Discov*. 2006 Dec;5(12):1015-25.
133. Moscona A. Neuraminidase inhibitors for influenza. *N Engl J Med*. 2005 Sep 29;353(13):1363-73.
134. Boivin G, Goyette N, Bernatchez H. Prolonged excretion of amantadine-resistant influenza A virus quasi species after cessation of antiviral therapy in an immunocompromised patient. *Clin Infect Dis*. 2002 Mar 1;34(5):E23-5.
135. Hay AJ, Zambon MC, Wolstenholme AJ, Skehel JJ, Smith MH. Molecular basis of resistance of influenza A viruses to amantadine. *J Antimicrob Chemother*. 1986 Oct;18 Suppl B:19-29.
136. Ziegler T, Hemphill ML, Ziegler ML, Perez-Orono G, Klimov AI, Hampson AW, et al. Low incidence of rimantadine resistance in field isolates of influenza A viruses. *J Infect Dis*. 1999 Oct;180(4):935-9.
137. Saito R, Oshitani H, Masuda H, Suzuki H. Detection of amantadine-resistant influenza A virus strains in nursing homes by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis with nasopharyngeal swabs. *J Clin Microbiol*. 2002 Jan;40(1):84-8.
138. Saito R, Sakai T, Sato I, Sano Y, Oshitani H, Sato M, et al. Frequency of amantadine-resistant influenza A viruses during two seasons featuring cocirculation of H1N1 and H3N2. *J Clin Microbiol*. 2003 May;41(5):2164-5.

139. Saito R, Li D, Suzuki H. Amantadine-resistant influenza A (H3N2) virus in Japan, 2005-2006. *N Engl J Med*. 2007 Jan 18;356(3):312-3.
140. Bright RA, Medina MJ, Xu X, Perez-Oroz G, Wallis TR, Davis XM, et al. Incidence of adamantane resistance among influenza A (H3N2) viruses isolated worldwide from 1994 to 2005: a cause for concern. *Lancet*. 2005 Oct 1;366(9492):1175-81.
141. Bright RA, Shay DK, Shu B, Cox NJ, Klimov AI. Adamantane resistance among influenza A viruses isolated early during the 2005-2006 influenza season in the United States. *JAMA*. 2006 Feb 22;295(8):891-4.
142. Hayden FG, Belshe RB, Clover RD, Hay AJ, Oakes MG, Soo W. Emergence and apparent transmission of rimantadine-resistant influenza A virus in families. *N Engl J Med*. 1989 Dec 21;321(25):1696-702.
143. Shiraishi K, Mitamura K, Sakai-Tagawa Y, Goto H, Sugaya N, Kawaoka Y. High frequency of resistant viruses harboring different mutations in amantadine-treated children with influenza. *J Infect Dis*. 2003 Jul 1;188(1):57-61.
144. Simonsen L, Viboud C, Grenfell BT, Dushoff J, Jennings L, Smit M, et al. The genesis and spread of reassortment human influenza A/H3N2 viruses conferring adamantane resistance. *Mol Biol Evol*. 2007 Aug;24(8):1811-20.
145. Deyde VM, Xu X, Bright RA, Shaw M, Smith CB, Zhang Y, et al. Surveillance of resistance to adamantanes among influenza A(H3N2) and A(H1N1) viruses isolated worldwide. *J Infect Dis*. 2007 Jul 15;196(2):249-57.
146. Varghese JN, Smith PW, Sollis SL, Blick TJ, Sahasrabudhe A, McKimm-Breschkin JL, et al. Drug design against a shifting target: a structural basis for resistance to inhibitors in a variant of influenza virus neuraminidase. *Structure*. 1998 Jun 15;6(6):735-46.
147. Colman PM, Varghese JN, Laver WG. Structure of the catalytic and antigenic sites in influenza virus neuraminidase. *Nature*. 1983 May 5-11;303(5912):41-4.
148. Baz M, Abed Y, Simon P, Hamelin ME, Boivin G. Effect of the neuraminidase mutation H274Y conferring resistance to oseltamivir on the replicative capacity and virulence of old and recent human influenza A(H1N1) viruses. *J Infect Dis*. 2010 Mar;201(5):740-5.
149. Gubareva LV, Matrosovich MN, Brenner MK, Bethell RC, Webster RG. Evidence for zanamivir resistance in an immunocompromised child infected with influenza B virus. *J Infect Dis*. 1998 Nov;178(5):1257-62.
150. Gubareva LV. Molecular mechanisms of influenza virus resistance to neuraminidase inhibitors. *Virus Res*. 2004 Jul;103(1-2):199-203.
151. Le QM, Kiso M, Someya K, Sakai YT, Nguyen TH, Nguyen KH, et al. Avian flu: isolation of drug-resistant H5N1 virus. *Nature*. 2005 Oct 20;437(7062):1108.

152. de Jong MD, Tran TT, Truong HK, Vo MH, Smith GJ, Nguyen VC, et al. Oseltamivir resistance during treatment of influenza A (H5N1) infection. *N Engl J Med*. 2005 Dec 22;353(25):2667-72.
153. Ruiz-Carrascoso G, Casas I, Pozo F, Perez-Gonzalez C, Reina J, Perez-Brena P, et al. Development and implementation of influenza A virus subtyping and detection of genotypic resistance to neuraminidase inhibitors. *J Med Virol*. 2010;82:843-53.
154. Coiras MT, Perez-Brena P, Garcia ML, Casas I. Simultaneous detection of influenza A, B, and C viruses, respiratory syncytial virus, and adenoviruses in clinical samples by multiplex reverse transcription nested-PCR assay. *J Med Virol*. 2003 Jan;69(1):132-44.
155. Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Mol Biol Evol*. 2011;28(10):2731-39.
156. Ronquist F, Huelsenbeck JP. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*. 2003;19(12):1572-74.
157. Keane TM, Creevey CJ, Pentony MM, Naughton TJ, McInerney JO. 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;6:29.
158. Huson DH, Richter DC, Rausch C, DeZulian T, Franz M, Rupp R. Dendroscope- An interactive viewer for large phylogenetic trees. *BMC Bioinformatics*. 2007;8:460.
159. Drummond AJ, Rambaut A. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evol Biol*. 2007;7(214).
160. Gupta R, Jung E, Brunak S. Prediction of N-glycosylation sites in human proteins. NetNGlyc 1.0 Server - prediction results. <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>
161. OPS-CDC. Protocolo generico para la vigilancia de la influenza. 2006.
162. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta C_t$ Method. *Methods*. 2001;25:402-8.
163. Cheng G, Ueda T, Eda F, Arima M, Yoshida N, Fukuda T. A549 Cells Can Express Interleukin-16 and Stimulate Eosinophil Chemotaxis. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2001;25:212-18.
164. FENTON MJ, VERMEULEN MW, KIM S, BURDICK M, STRIETER RM, KORNFIELD H. Induction of Gamma Interferon Production in Human Alveolar Macrophages by *Mycobacterium tuberculosis*. *Infection Immunity*. 1997;65(12):5149-56.
165. Matsukura S, Kokubu F, Noda H, Tokunaga H, Adachi M. Expression of IL-6, IL-8, and RANTES on human bronchial epithelial cells, NCI-H292, induced by influenza virus A. *J Allergy Clin Immunol*. 1996 Dec;98(6 Pt 1):1080-7.

166. Armstrong L, Medford ARL, Uppington KM, Robertson J, Witherden IR, Tetley TD, et al. Expression of functional Toll-like receptor (TLR-)2 and TLR-4 on alveolar epithelial cells. AJRCMB. 2004;Article in Press:doi:10.1165/rcmb.2004-0078OC.
167. Bakshi SS ZL, HoD, Than S, Pahwa SG. Distribution of CCR5D32 in Human Immunodeficiency Virus-Infected Children and Its Relationship to Disease Course. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology. 1998;5(1):38-40.
168. WHO. WHO information for molecular diagnosis of influenza virus in humans-update. http://www.who.int/influenza/resources/documents/molecular_diagnosis_influenza_virus_humans_update_201108pdf. 2011.
169. Plotkin JB, Dushoff J, Levin SA. Hemagglutinin sequence clusters and the antigenic evolution of influenza A virus. Proc Natl Acad Sci U S A. 2002 Apr 30;99(9):6263-8.
170. Fiore AE, Shay DK, Broder K, Iskander JK, Uyeki TM, Mootrey G, et al. Prevention and control of influenza: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP), 2008. MMWR Recomm Rep. 2008 Aug 8;57(RR-7):1-60.
171. Yang JR, Lin CH, Chen CJ, Liu JL, Huang YP, Kuo CY, et al. A new antigenic variant of human influenza A (H3N2) virus isolated from airport and community surveillance in Taiwan in early 2009. Virus Res. 2010;151:33-8.
172. Daplat IC, Daplat C, Baranovich T, Suzuki Y, Kondo H, Shobugawa Y, 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):e36475.
173. Boni MF. Vaccination and antigenic drift in influenza. Vaccine. 2008 Jul 18;26 Suppl 3:C8-14.
174. Boni MF, Gog JR, Andreasen V, Christiansen FB. Influenza drift and epidemic size: the race between generating and escaping immunity. Theor Popul Biol. 2004 Mar;65(2):179-91.
175. Ren X, Ju LW, Yang JX, Lv XH, Jiang LF, Zhao NQ, et al. Antigenic and Genetic Variation in the Hemagglutinins of H1N1 and H3N2 Human Influenza A Viruses in the Shanghai Area From 2005 to 2008. J Med Virol. 2011;83:1113-20.
176. Bulimo WD, Achilla RA, Majanja J, Mukunzi S, Wadegu M, Osunna F, et al. Molecular Characterization and Phylogenetic Analysis of the Hemagglutinin 1 Protein of Human Influenza A Virus Subtype H1N1 Circulating in Kenya During 2007–2008. J Infect Dis. 2012;206(S1):46-52.
177. Falchi A, Amoros JP, Arena C, Arrighi J, Casabianca F, Andreoletti L, et al. Genetic structure of human A/H1N1 and A/H3N2 influenza virus on Corsica Island: phylogenetic analysis and vaccine strain match, 2006-2010. PLoS One. 2011;6(9):e24471.
178. Mossad SB. 2008-2009 Influenza update: a better vaccine match. Cleve Clin J Med. 2008 Dec;75(12):865-70.

179. Suwannakarn K, Chieochansin T, Thongmee C, Makkoch J, Praianantathavorn K, Theamboonlers A, et al. Molecular Evolution of Human H1N1 and H3N2 Influenza A Virus in Thailand, 2006-2009. *PLoS One*. 2010;5(3):e9717.
180. Gerhard W, Yewdell J, Frankel ME, Webster R. Antigenic structure of influenza virus haemagglutinin defined by hybridoma antibodies. *Nature*. 1981 Apr 23;290(5808):713-7.
181. Chen R, Holmes EC. The evolutionary dynamics of human influenza B virus. *J Mol Evol*. 2008 Jun;66(6):655-63.
182. Pariani E, Amendola A, Zappa A, Bianchi S, Colzani D, Anselmi G, et al. Molecular characterization of influenza viruses circulating in Northern Italy during two seasons (2005/2006 and 2006/2007) of low influenza activity. *J Med Virol*. 2008 Nov;80(11):1984-91.
183. Belshe RB. The need for quadrivalent vaccine against seasonal influenza. *Vaccine*. 2010;28S:D45-53.
184. Potdar VA, Chadha MS, Jadhav SM, Mullick J, Cherian SS, Mishra AC. Genetic Characterization of the Influenza A Pandemic (H1N1) 2009 Virus Isolates from India. *PLoS One*. 2010;5(3):e9693.
185. Nelson M, Spiro D, Wentworth D, Beck E, Fan J, Ghedin E, et al. The early diversification of influenza A/H1N1pdm. *PLoS Curr Influenza*. 2009:RRN1126.
186. Pan C, Cheung B, Tan S, Li C, Li L, Liu S, et al. Genomic signature and mutation trend analysis of pandemic (H1N1) 2009 influenza A virus. *PLoS One*. 2010;5(3):e9549.
187. Wei CJ, Boyington JC, Dai K, Houser KV, Pearce MB. Crossneutralization of 1918 and 2009 influenza viruses: role of glycans in viral evolution and vaccine design. *Sci Transl Med*. 2010;2(24):21.
188. Das SR, Hensley SE, David A, Schmidt L, Gibbs JS, Puigbò P, et al. Fitness costs limit influenza A virus hemagglutinin glycosylation as an immune evasion strategy. *PNAS MICROBIOLOGY*. 2011(Early edition):1-6.
189. Das S, Puigbo P, Hensley SE, Hurt DE, Bennink JR. Glycosylation Focuses Sequence Variation in the Influenza A Virus H1 Hemagglutinin Globular Domain. *PLoS Pathog*. 2011;6(11):e1001211.
190. Reichert T, Chowell G, Nishiura H, Christensen RA, McCullers JA. Does Glycosylation as a modifier of Original Antigenic Sin explain the case age distribution and unusual toxicity in pandemic novel H1N1 influenza? *BMC Infect Dis*. 2010;10:5.
191. Hough HSH, Garner J, Zhou Y, Lyons A, Kuschner R, Deye G, et al. Emergent 2009 influenza A(H1N1) viruses containing HA D222N mutation associated with severe clinical outcomes in the Americas. *J Clin Virol*. In press 2011.

192. Xu R, Ekiert DC, Krause JC, Hai R, Crowe JE, Wilson IA. Structural basis of preexisting immunity to the 2009 H1N1 pandemic influenza virus. *Science*. 2010;328(5976):357-60.
193. Graham M, Liang B, Van Domselaar G, Bastien N, Beaudoin C, Tyler S, et al. Nationwide Molecular Surveillance of Pandemic H1N1 Influenza A Virus Genomes: Canada, 2009. *PLoS One*. 2011;6(1):e16087.
194. Piralla A, Pariani E, Rovida F, Campanini G, Muzzi A, Emmi V, et al. Segregation of Virulent Influenza A(H1N1) Variants in the Lower Respiratory Tract of Critically Ill Patients during the 2010–2011 Seasonal Epidemic. *PLoS One*. 2011;6(12):e28332.
195. Strengell M, Ikonen N, Ziegler T, Julkunen I. Minor Changes in the Hemagglutinin of Influenza A(H1N1)2009 Virus Alter Its Antigenic Properties. *PLoS One*. 2011;6(10):e25848.
196. Kilander A, Rykkvin R, Dudman SG, Hungnes O. Observed association between the HA1 mutation D222G in the 2009 pandemic influenza A(H1N1) virus and severe clinical outcome, Norway 2009-2010. *Euro Surveill*. 2010;15(9).
197. WHO. Preliminary review of D222G amino acid substitution in the haemagglutinin of pandemic influenza A (H1N1) 2009 viruses. *Wkly Epidemiol Rec*. 2010 Jan 22;85(4):21-2.
198. Antón A, Marcos MA, Martínez MJ, Ramón S, Martínez A, Cardenosa N, et al. D225G mutation in the hemagglutinin protein found in 3 severe cases of 2009 pandemic influenza A (H1N1) in Spain. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2010;67:207-8.
199. Tumpey TM, Maines TR, Van Hoeven N, Glaser L, Solorzano A, Pappas C, et al. A two-amino acid change in the hemagglutinin of the 1918 influenza virus abolishes transmission. *Science*. 2007 Feb 2;315(5812):655-9.
200. Chan PKS, Lee N, Joynt GM, Choi KW, Cheung J, Yeung AC, et al. Clinical and virological course of infection with haemagglutinin D222G mutant strain of 2009 pandemic influenza A (H1N1) virus. *J Clin Virol*. 2011;50:320-24.
201. Belser JA, Jayaraman A, Raman R, Pappas C, Zeng H, Cox NJ, et al. Effect of D222G Mutation in the Hemagglutinin Protein on Receptor Binding, Pathogenesis and Transmissibility of the 2009 Pandemic H1N1 Influenza Virus. *PLoS One*. 2011;6(9):e25091.
202. Mak GC, Au KW, Tai LS, Chuang KC, Cheng KC, Shiu TC, et al. Association of D222G substitution in haemagglutinin of 2009 pandemic influenza A (H1N1) with severe disease. *Euro Surveill*. 2010;15(14):19534.
203. Igarashi M, Ito K, Yoshida R, Tomabechei D, Kida H, Takada A. Predicting the antigenic structure of the pandemic (H1N1) 2009 influenza virus hemagglutinin. *PLoS One*. 2010;5(1):e8553.
204. Yang H, Carney P, Stevens J. Structure and Receptor binding properties of a pandemic H1N1 virus hemagglutinin. *PLoS Curr Influenza*. 2010;RRN1152.

205. Wang W, Castelán-Vega JA, Jiménez-Alberto A, Vassell R, Ye Z, Weiss CD. A mutation in the receptor binding site enhances infectivity of 2009 H1N1 influenza hemagglutinin pseudotypes without changing antigenicity. *Virology*. 2010;407(374-80).
206. Soto-Abraham MV, Soriano-Rosas J, Díaz-Quinónez A, Silva-Pereyra J, Vazquez-Hernandez P, Torres-López O, et al. Pathological changes associated with the 2009 H1N1 virus. *N Engl J Med*. 2009;361(20):2001-3.
207. Karlas A, Machuy N, Shin Y, Pleissner KP, Artarini A, Heuer D, et al. Genome-wide RNAi screen identifies human host factors crucial for influenza virus replication. *Nature*. 2010 Feb 11;463(7282):818-22.
208. Woo PC, Tung ET, Chan KH, Lau CC, Lau SK, Yuen KY. Cytokine profiles induced by the novel swine-origin influenza A/H1N1 virus: implications for treatment strategies. *J Infect Dis*. 2009 Feb 1;201(3):346-53.
209. Van Reeth K. Cytokines in the pathogenesis of influenza. *Vet Microbiol*. 2000 May 22;74(1-2):109-16.
210. Brydon EW, Morris SJ, Sweet C. Role of apoptosis and cytokines in influenza virus morbidity. *FEMS Microbiol Rev*. 2005 Sep;29(4):837-50.
211. Thomas LH, Wickremasinghe MIY, Friedland JS. IL-1 β stimulates divergent upper and lower airway epithelial cell CCL5 secretion. *Clin Immunol*. 2007;122:229-38.
212. Salaun B, Romero P, Lebecque S. Toll-like receptors' two-edged sword: when immunity meets apoptosis. *Eur J Immunol*. 2007;37:3311-8.
213. Taro Kawai SA. The roles of TLRs, RLRs and NLRs in pathogen recognition. *International Immunology*. 2009;21(4):317-37.
214. Fadel SA, Bromley SK, Medoff BD, Luster AD. CXCR3-deficiency protects influenza-infected CCR5-deficient mice from mortality. *Eur J Immunol*. 2008 Dec;38(12):3376-87.
215. Keynan YJ, J. Meyers, A. Ball, T. B. Kumar, A. Rubinstein, E. Fowke, K.R. Chemokine Receptor 5 Δ 32 Allele in Patients with Severe Pandemic (H1N1) 2009. *Emerging Infectious Diseases*. 2009 October 2010;16(10).
216. Kohlmeier JEM, S. C. Smith, J. Lu, B. Gerard, C. Cookenham, T. Roberts, A.D. Woodland, D.L. . The Chemokine Receptor CCR5 Plays a Key Role in the Early Memory CD8+ T Cell Response to Respiratory Virus Infections. *Immunity*. 2008;29:101-13.
217. Salentin R, Gemsa D, Sprenger H, Kaufmann A. Chemokine receptor expression and chemotactic responsiveness of human monocytes after influenza A virus infection. *J Leukoc Biol*. 2003 Aug;74(2):252-9.

218. Wareing MD, Lyon A, Inglis C, Giannoni F, Charo I, Sarawar SR. Chemokine regulation of the inflammatory response to a low-dose influenza infection in CCR2^{-/-} mice. *J Leukoc Biol.* 2007 Mar;81(3):793-801.
219. Loetscher PU, M. Bordoli, L. Baggiolini, M. Moser, B. CCR5 is characteristic of Th1 lymphocytes. *NATURE.* 1998;391.
220. Amiram A, Fredman G, Sun Y-P, Kantarci A, Van Dyke TE, Luster AD, et al. Apoptotic neutrophils and T cells sequester chemokines during immune response resolution through modulation of CCR5 expression. *nat immunol.* 2006;7(11):1209-16.
221. Fiore AE, Uyeki TM, Broder K, Finelli L, Euler GL, Singleton JA, et al. Prevention and control of seasonal influenza with vaccines: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP), 2010. *MMWR Recomm Rep.* 2010 August 6, 2010 59(RR-08):1-62.
222. Walsh KB, Teijaro JR, Wilker PR, Jatzek A, Fremgen DM, Das S, et al. Suppression of cytokine storm with a sphingosine analog provides protection against pathogenic influenza virus. *PNAS MICROBIOLOGY.* 2011;18(29):12018-23.
223. Arankalle VA, Lole KS, Arya RP, Tripathy AS, Ramdasi AY, Chadha MS, et al. Role of host immune response and viral load in the differential outcome of pandemic H1N1 (2009) influenza virus infection in Indian patients. *PLoS One.* 2010;5(10):e13099.doi:10.1371/journal.pone.0013099.
224. Das K, Aramini JM, Ma LC, Krug RM, Arnold E. Structures of influenza A proteins and insights into antiviral drug targets. *Nat Struct Mol Biol.* 2010;17(5):530-8.
225. Deyde V, Garten R, Sheu T, Smith C, Myrick A, Barnes J, et al. Genomic events underlying the changes in adamantane resistance among influenza A(H3N2) viruses during 2006–2008. *Influenza Other Respi Viruses.* 2009;3(6):297-314.
226. Jonges M, van der Lubben IM, Dijkstra F, Verhoef L, Koopmans M, Meijer A. Dynamics of antiviral-resistant influenza viruses in the Netherlands, 2005-2008. *Antiviral Res.* 2009 Jul 8.
227. Pabbaraju K, Ho KC, Wong S, Shokoples S, Pang XL, Fonseca K, et al. Adamantane resistance in circulating human influenza A viruses from Alberta, Canada (1970-2007). *Antiviral Res.* 2008 Aug;79(2):81-6.
228. Beigel J, Bray M. Current and future antiviral therapy of severe seasonal and avian influenza. *Antiviral Res.* 2008 Apr;78(1):91-102.
229. Peiris JS, Poon LL, Guan Y. Emergence of a novel swine-origin influenza A virus (S-OIV) H1N1 virus in humans. *J Clin Virol.* 2009 Jul;45(3):169-73.
230. Kiso M, Shinya K, Shimojima M, Takano R, Takahashi K, Katsura H, et al. Characterization of Oseltamivir-Resistant 2009 H1N1 Pandemic Influenza A Viruses. *PLoS Pathog.* 2010;6(8):e1001079.

231. Thorlund K, Awad T, Boivin G, Thabane L. Systematic review of influenza resistance to the neuraminidase inhibitors. *BMC Infect Dis.* 2011;11(134).
232. Pérez-Rodríguez AE, González-Ochoa E, Expósito-Rivas L, Rodríguez-Leyva O. Experience with the use of amantadine for the control of an influenza outbreak at an Elderly Home. *Rev Cubana Med Trop.* 1990;42(2):261-71.
233. Pérez-Rodríguez AE, González-Ochoa E, de Armas-Pérez L, Goyenechea-Hernández A. Evaluation of an anti-influenza vaccine in a group of elderly. *Rev Cubana Med Trop.* 1990;42(1):90-100.
234. Hayden FG, Treanor JJ, Fritz RS, Lobo M, Betts RF, Miller M, et al. Use of the oral neuraminidase inhibitor oseltamivir in experimental human influenza: randomized controlled trials for prevention and treatment. *JAMA.* 1999 Oct 6;282(13):1240-6.
235. Sheu TG, Deyde VM, Okomo-Adhiambo M, Garten RJ, Xu X, Bright RA, et al. Surveillance for neuraminidase inhibitor resistance among human influenza A and B viruses circulating worldwide from 2004 to 2008. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008 Sep;52(9):3284-92.
236. Dharan NJ, Gubareva LV, Meyer JJ, Okomo-Adhiambo M, McClinton RC, Marshall SA, et al. Infections with oseltamivir-resistant influenza A(H1N1) virus in the United States. *JAMA.* 2009 Mar 11;301(10):1034-41.
237. Esposito S, Molteni CG, Daleno C, Valzano A, Fossali E, Da Dalt L. Clinical importance and impact on the households of oseltamivir-resistant seasonal A/H1N1 influenza virus in healthy children in Italy. *Virol J.* 2010;7:202.
238. Casalegno JS, Bouscambert-Duchamp M, Caro V, Schuffenecker I, Sabatier M, Traversier A. Oseltamivir-resistant influenza A(H1N1) viruses in south of France, 2007/2009. *Antiviral Res.* 2010;87(2):242-48.
239. Renaud C, Kuypers J, Englund JA. Emerging oseltamivir resistance in seasonal and pandemic influenza A/H1N1. *J Clin Virol.* 2011;52:70-8.
240. Ujike M, Shimabukuro K, Mochizuki K, Obuchi M, Kageyama T, Shirakura M. Oseltamivir-resistant influenza viruses A (H1N1) during 2007–2009 influenza seasons, Japan. *Emerg Infect Dis.* 2010;16(6):926-35.
241. Hauge SH, Dudman S, Borgen K, Lackenby A, Hungnes O. Oseltamivir-resistant influenza viruses A (H1N1), Norway, 2007-08. *Emerg Infect Dis.* 2009 Feb;15(2):155-62.
242. Bloom JD, Gong LI, Baltimore D. Permissive secondary mutations enable the evolution of influenza oseltamivir resistance. *Science.* 2010;328(5983):1272-5.
243. Memoli MJ, Davis AS, Proudfoot K, Chertow DS, Hrabal RJ, Bristol T. Multidrug-resistant 2009 pandemic influenza A(H1N1) viruses maintain fitness and transmissibility in ferrets. *J Infect Dis.* 2010;210(10):348-57.

244. Kaverin NV, Gambaryan AS, Bovin NV, Rudneva IA, Shilov AA, Khodova OM, et al. Postreassortment changes in influenza A virus hemagglutinin restoring HA-NA functional match. *Virology*. 1998 May 10;244(2):315-21.
245. Mishin VP, Novikov D, Hayden FG, Gubareva LV. Effect of hemagglutinin glycosylation on influenza virus susceptibility to neuraminidase inhibitors. *J Virol*. 2005 Oct;79(19):12416-24.
246. Leo YS, Lye DC, Chow A. Influenza in the tropics. *Lancet Infect Dis*. 2009 Aug;9(8):457-8.
247. Lipsitch M, Viboud C. Influenza seasonality: lifting the fog. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Mar 10;106(10):3645-6.
248. Oxford JS. Antivirals for the treatment and prevention of epidemic and pandemic influenza. *Influenza Other Respi Viruses*. 2007 Jan;1(1):27-34.
249. Jombart T, Eggo RM, Dodd P, Balloux F. Spatiotemporal dynamics in the early stages of the 2009 A/H1N1 influenza pandemic. *PLoS Curr Influenza*. 2009:RRN1026.
250. Charu V, Chowell G, Palacio Mejia LS, Echevarria-Zuno S, Borja-Aburto VH, Simonsen L, et al. Mortality Burden of the A/H1N1 Pandemic in Mexico: A Comparison of Deaths and Years of Life Lost to Seasonal Influenza. *Clin Infect Dis*. 2011 Nov;53(10):985-93.
251. Nijhuis M, van Maarseveen NM, Boucher CA. Antiviral resistance and impact on viral replication capacity: evolution of viruses under antiviral pressure occurs in three phases. *Handb Exp Pharmacol*. 2009(189):299-320.



Anexo 1

Publicaciones científicas donde han sido presentados los resultados de la tesis.

- **Piñón A**, Acosta B, Valdés O, Arencibia A, Savón CE, González G, Oropesa SI, Quilarte E, González G, Hernández B, Goyenechea A, Guzmán MG, Llop A, Kourí V. Estrategia cubana de caracterización molecular del virus influenza A/H1N1pdm. Rev Cubana Med Trop, 2011, 63(1): 21-29.
- **Piñón A**, Acosta B, Valdés O, Arencibia A, Muné M, Savón CE, Goyenechea A, González G, Oropesa SI, Hernández B. Molecular and phylogenetic analysis of influenza A/H1N1 pandemic viruses in Cuba, May/2009-August/2010. Intl J Infectious Disease, 2013 Mar 24; pii: S1201-9712(13)00080-5. doi: 10.1016/j.ijid.2013.01.028.
- **Piñón A**, Acosta B, Valdés O, Pérez A, Muné M, Arencibia A, Savón CE, Goyenechea A, Oropesa SI, González G, Hernández B. Adamantane and neuraminidase inhibitors resistance from circulating human influenza A viruses in Cuba. Intl J Antimicrobial Agents, 2013, 42:94-98.
- Valdés O, **Piñón A**, Acosta B, Savón C, González G, Arencibia A, Guilarte E, González G, Oropesa S, Hernández B, Goyenechea A. Diseño y aplicación de un método molecular para el diagnóstico del virus influenza A (H1N1) pandémico en Cuba. Rev Cubana Med Trop, 2011, 63 (1): 15-20.
- Acosta B, **Piñón A**, Valdés O, Savón C, Arencibia A, Guilarte E, y cols. Rapid diagnosis of pandemic (H1N1) 2009 in Cuba. Emerg Infect Dis Volume 18, Number 2–February 2012 [Disponible on line] <http://dx.doi.org/10.3201/eid1802.110547>.
- Acosta B, **Piñón A**, Valdés O, Savón C, Guzmán MG, Llop A, y cols. Contribución del Laboratorio Nacional de Influenza al enfrentamiento de la influenza pandémica 2009 en Cuba. Rev Cub Med Trop 2011;63(1):7-14.

Eventos científicos donde han sido presentados los resultados de la tesis.

- **Biotechnología Habana 2012. CIGB. Cuba, Marzo 2012:**

Presentación de cartel: Evaluación de la actividad antiviral in vitro de dos especies de algas marinas frente a virus influenza y herpesvirus humano. Pérez, A, Torres Y, **Piñón A**, Valdés O, Parra F, del Barrio G.

- **Cubafarmacia 2012. La Habana, Cuba, 9-11 Mayo, 2012:**

Presentación de cartel: Actividad antiviral in vitro de tres especies de algas frente a virus influenza. Pérez, A, **Piñón A**, Morier LF, Acosta B, Mendoza D, del Barrio G.

- **Taller Internacional de Ciencias Farmacéuticas y Alimentarias 2012, La Habana, Cuba, 9-10 Julio, 2012:**

Presentación de cartel: Metodología para la evaluación de la actividad anti-influenza de extractos naturales. Pérez, A, **Piñón A**, Valdés O, Acosta B, Morier LF, Rojas L, del Barrio G.

- **X Congress of the Latin-American Association of Immunology-ALAI, Immunoperú 2012, Lima, Perú, 29 mayo-2 Junio, 2012:**

Presentación de cartel: Evidence of RANTES/CCL5 and ccr5 gen polymorphism contribution to severe disease in patients infected with influenza virus H1N1pdm09 in Cuba. **Piñón A**, Muné M, Adams Y, Acosta B, Valdés O, Savón C, Goyenechea A, González G, Oropesa S, González G, Hernández B, Pérez AB.

- **International 9th John Humphrey Advanced Immunology Course "Adaptive and Innate Immunity". Marzo 2012, La Habana, Cuba:**

Presentación de cartel: The expression of inflammatory mediators in patients with influenza A(H1N1)2009 virus infection. Adams Y, **Piñón A**, Valdés O, Muné M, Acosta B.

- **7mo Congreso de Inmunología, La Habana, Cuba, 26-27 Mayo, 2012:**

Presentación de cartel: Citocinas proinflamatorias en pacientes con diagnóstico de infección por influenza A(H1N1)2009 en Cuba. Adams Y, **Piñón A**, Valdés O, Acosta B.

- **Convención Internacional de Salud, Cuba Salud 2012, 3-7 Diciembre 2012, la Habana, Cuba:**

Rantes y CCR5: factores contribuyentes a la gravedad de la infección por el virus influenza A (H1N1) PDM09. **Piñón A**, Acosta B, Muné M, Adams Y, Valdés O, Savón C, Arencibia A, González G, Oropesa S, Goyenechea A, González G, Hernández B. Cartel.

Caracterización molecular de los virus influenza circulantes en Cuba en el período abril 2009-agosto 2010. Arencibia A, **Piñón A**, Muné M, Acosta B, Valdés O, Savón C, Oropesa S, González G, Goyenechea A, Soto Y, Guilarte E, González G, Hernández B. Cartel

Vigilancia de laboratorio de la influenza pandémica en Cuba. Acosta B, **Piñón A**, Valdés O, Savón C, Muné M, Arencibia A, Guzmán MG, Llop A, Guilarte E, González G, Oropesa S, Gonzalez G, Hernández B, Kourí V, Goyenechea A. Cartel.

Reconocimientos a los resultados presentados en la tesis.

- Logro de la Academia de Ciencias de Cuba (Febrero 2010). Logros de una estrategia emergente de laboratorio para el enfrentamiento de la influenza pandémica 2009 en Cuba. B Acosta, **A Piñón**, O Valdés, C Savón, MG Guzmán, A Llop y cols.
- Resultados relevantes en XVII Forum Provincial de Ciencia y técnica. Septiembre 2010. Logros de una estrategia emergente de laboratorio para el enfrentamiento de la influenza pandémica 2009 en Cuba. B Acosta, **A Piñón**, O Valdés, C Savón, MG Guzmán, A Llop, A Arencibia, y cols.
- Concurso Central del Premio Anual de Salud, 2012. Premio en la categoría de investigaciones de Sistemas y servicios de Salud (junio 2012). Logros de la estrategia de laboratorio para la vigilancia de la influenza pandémica 2009 en Cuba. B Acosta, **A Piñón**, O Valdés, C Savón, MG Guzmán, A Llop y cols.

Trabajos de tesis.

- Tesis de maestría en Virología de la Universidad de La Habana. Actividad antiviral in vitro de tres especies de algas frente a Virus Influenza. Defendida en febrero/2012. Amilcar Pérez. **Tutor: Lic. Alexander Piñón**, Dra. Gloria de Barrio.
- Tesis de maestría en Virología IPK. Caracterización Molecular de los virus Influenza Circulantes en Cuba en el periodo abril 2009 –Agosto 2010. Defendida en marzo/2012. **Tutor: Lic. Alexander Piñón**, Dra. Mayra Muné. Asesores: Prof. Belsy Acosta, Dra. Odalys Valdés.
- Tesis de Especialista de primer grado en Inmunología. Título: Citocinas Pro inflamatorias y quimiocinas en Pacientes Graves y fallecidos por influenza A (H1N1) 2009 Pandémica. Dra. Yamila Adams. **Tutor: Lic Alexander Piñón**, Dra Odalys Valdés. Asesores: Dra Mayra Muné, Dra Belsy Acosta

Anexo 2

Números de acceso de las secuencias de la hemaglutinina correspondientes a las cepas de referencia utilizadas para la edición y análisis filogenéticos.

Temporada	Cepa de referencia	Acceso al GenBank
2006-2008	A/Wisconsin/67/2005(H3N2)	CY034116
2008-2010	A/Brisbane/10/2007(H3N2)	CY039087
2010-2011	A/Perth/16/2009(H3N2)	GQ293081
2005-2007	A/New Caledonia/20/1999(H1N1)	CY031336
2007-2008	A/Solomon Islands/3/2006(H1N1)	EU124177
2008-2010	A/Brisbane/59/2007(H1N1)	CY030232
2006-2008	B/Malaysia/2506/2004	CY038287
2008-2009	B/Florida/4/2006	EU515992
2009-2011	B/Brisbane/60/2008	FJ766842

Anexo 3

Números de acceso de las secuencias de un segmento de la región HA1 de la hemaglutinina de los virus influenza A(H1N1) estacional, A(H3N2) e influenza B obtenidas a partir de las muestras de pacientes cubanos.

Cepas cubanas	Acceso al GenBank
Influenza A(H1N1)estacional	
A/HABANA/352/2007	JX4592679
A/HABANA/353/2007	JX4592680
A/HABANA/168/2008	JX4592681
A/HABANA/172/2008	JX4592682
A/HABANA/176/2008	JX4592683
A/HABANA/177/2008	JX4592684
A/HABANA/178/2008	JX4592685
A/HABANA/179/2008	JX4592686
A/HABANA/240/2008	JX4592687
A/HABANA/922/2009	JX4592688
A/HABANA/942/2009	JX4592689
A/HABANA/1156/2009	JX4592690
A/HABANA/625/2009	JX4592691
A/HABANA/352/2007	JX4592679
Influenza A(H3N2)	
A/Habana/292/2006	EU179797
A/HABANA/27/2007	JX853781
A/HABANA/181/2007	JX894567
A/HABANA/199/2007	JX894568
A/HABANA/200/2007	JX894569
A/HABANA/203/2007	JX894570
A/HABANA/301/2007	JX894571
A/HABANA/302/2007	JX894572
A/HABANA/307/2007	JX853782
A/HABANA/347/2007	JX894573
A/HABANA/123/2009	HQ190935
A/Habana/692/2009	JX894574
A/HABANA/664/2009	JX853783
A/HABANA/778/2009	JX853784

A/Habana/957/2009	JX894575
A/HABANA/1044/2009	JX894576
A/HABANA/1292/2009	JX853785
A/Habana/3647/2009	JX894577
A/HABANA/11052/2010	HQ190936
A/HABANA/14840/2010	JX853786
A/HABANA/15447/2010	JX853787
A/HABANA/15722/2010	JX853786
Influenza B	
B/HABANA/103/2006	JX4592655
B/HABANA/110/2006	JX4592656
B/HABANA/145/2006	JX4592657
B/HABANA/15467/2010	JX4592658
B/HABANA/1645/2009	JX4592659
B/HABANA/2136/2009	JX4592660
B/HABANA/14278/2010	JX4592661
B/HABANA/15468/2010	JX4592662
B/HABANA/15596/2010	JX4592663
B/HABANA/15835/2010	JX4592664
B/HABANA/159/2006	JX4592665
B/HABANA/29/2009	JX4592666
B/HABANA/283/2006	JX4592667
B/HABANA/286/2006	JX4592668
B/HABANA/288/2006	JX4592669
B/HABANA/72/2006	JX4592670
B/HABANA/89/2006	JX4592671
B/HABANA/93/2006	JX4592672
B/HABANA/96/2006	JX4592673
A/HABANA/65/2009	JX4592674
A/HABANA/103/2009	JX4592675
A/HABANA/117/2008	JX4592676
A/HABANA/260/2008	JX4592677

Anexo 4

Números de acceso de las secuencias de un segmento de la región HA1 de la hemaglutinina de los virus influenza A(H1N1)pdm09 obtenidas a partir de las muestras de pacientes cubanos.

Cepas cubanas	Acceso al GenBank
A/Habana/11/2009	HM176610.1
A/Habana/14/2009	HM176609.1
A/Habana/54/2009	JQ922272
A/Habana/128/2009	HM176611.1
A/Habana/289/2009	JQ922273
A/Habana/353/2009	JQ922274
A/Habana/1235/2009	JQ922275
A/Habana/1383/2009	JQ922276
A/Habana/2030/2009	JQ922277
A/Habana/2177/2009	JQ922278
A/Habana/2665/2009	HM176606.1
A/Habana/2687/2009	HM176607.1
A/Habana/2700/2009	HM176608.1
A/Habana/3469/2009	JQ922279
A/Habana/3528/2009	JQ922280
A/Habana/3578/2009	JQ922281
A/Habana/3619/2009	JQ922282
A/Habana/4144/2009	JQ922283
A/Habana/4613/2009	HM159409.1
A/Habana/4622/2009	HM159410.1
A/Habana/4677/2009	HM159411.1
A/Habana/4683/2009	HM159412.1
A/Habana/4714/2009	HM159413.1
A/Habana/4725/2009	HM159414.1
A/Habana/4743/2009	HM159415.1
A/Habana/5392/2009	HM159417.1
A/Habana/5417/2009	HM159416.1
A/Habana/5456/2009	HM159418.1
A/Habana/5550/2009	JQ922284
A/Habana/6449/2009	JQ922285
A/Habana/6970/2010	JQ922286

A/Habana/7326/2010	JQ922287
A/Habana/7374/2010	HQ190941.1
A/Habana/9696/2010	JQ922288
A/Habana/9765/2010	HQ190937.1
A/Habana/9790/2010	JQ922289
A/Habana/9937/2010	HQ190938.1
A/Habana/10291/2010	HQ190939.1
A/Habana/10773/2010	JQ922290
A/Habana/10853/2010	JQ922291
A/Habana/10904/2010	JQ922292
A/Habana/11106/2010	JQ922293
A/Habana/11659/2010	JQ922294
A/Habana/11757/2010	JQ922295
A/Habana/11955/2010	JQ922296
A/Habana/13623/2010	JQ922297
A/Habana/14511/2010	JQ922298
A/Habana/15203/2010	JQ922299

Anexo 5

Números de acceso de las secuencias de referencia utilizadas para la edición de las secuencias de un segmento de los genes de la matriz y la neuraminidasa.

Temporada	Cepa de referencia	Acceso al GenBank	
		Gen M	Gen NA
2006-2008	A/Wisconsin/67/2005(H3N2)	EU100611	EF541463.1
2008-2010	A/Brisbane/10/2007(H3N2)	CY031812	EU199420.1
2010-2011	A/Perth/16/2009(H3N2)	-	GQ293082
2005-2007	A/New Caledonia/20/1999(H1N1)	DQ508860.1	AJ518092
2007-2008	A/Solomon Islands/3/2006(H1N1)	CY031341	EU124136
2008-2010	A/Brisbane/59/2007(H1N1)	CY031391	CY058489
2006-2008	B/Malaysia/2506/2004	-	EF566434
2008-2009	B/Florida/4/2006	-	EU515938
2009-2011	B/Brisbane/60/2008	-	FJ766839
2009-2011	A/California/07/2009 (H1N1)pdm09	-	FJ984386.1

Anexo 6

Números de acceso de las secuencias de un segmento del gen de la matriz y la neuraminidasa de los virus influenza obtenidas a partir de las muestras de pacientes cubanos.

Subtipo	Cepas cubanas	Acceso el GenBank (Gen de la proteína M)
H3N2	A/HABANA/306/2006	JX549342
	A/HABANA/27/2007	JX549343
	A/HABANA/199/2007	JX549344
	A/HABANA/200/2007	JX549345
	A/HABANA/300/2007	JX549346
	A/HABANA/302/2007	JX549347
	A/HABANA/307/2007	JX549348
	A/HABANA/389/2009	JX549349
	A/HABANA/664/2009	JX549350
H1N1estacional	A/HABANA/190/2006	JX549374
	A/HABANA/352/2007	JX549375
	A/HABANA/353/2007	JX549376
	A/HABANA/354/2007	JX549377
	A/HABANA/168/2008	JX549378
	A/HABANA/177/2008	JX549379
	A/HABANA/179/2008	JX549380
	A/HABANA/1156/2009	JX549381
H1N1pdm09	A/HABANA/3578/2009	JX549366
	A/HABANA/4144/2009	JX549367
	A/HABANA/11106/2010	JX549368
	A/HABANA/11955/2010	JX549369

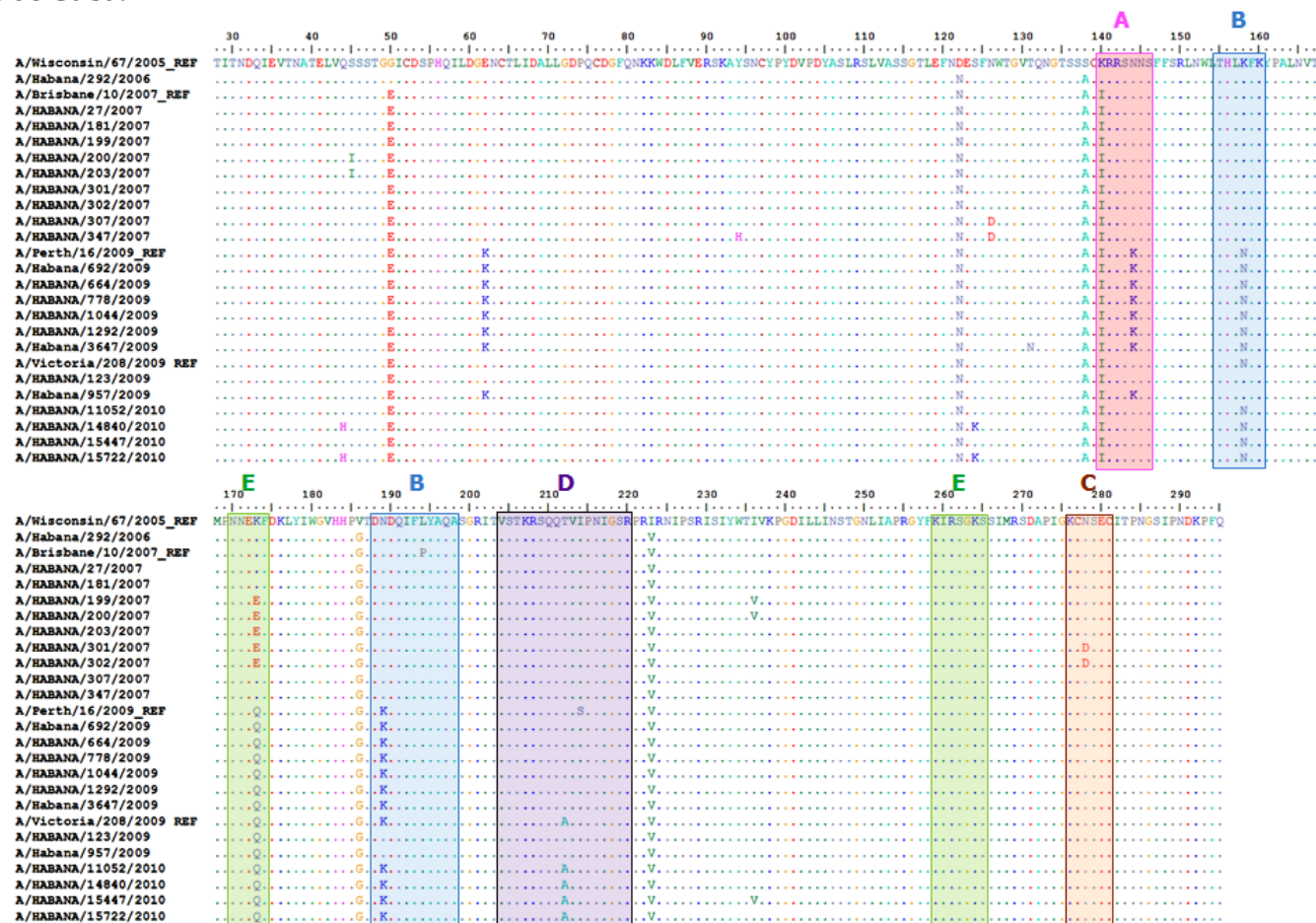
Subtipo	Cepas cubanas	Acceso el GenBank (Gen de la proteína NA)
H3N2	A/HABANA/306/2006	JX556133
	A/HABANA/27/2007	JX556134
	A/HABANA/199/2007	JX556135
	A/HABANA/200/2007	JX556136
	A/HABANA/217/2007	JX556137
	A/HABANA/221/2007	JX556138
	A/HABANA/307/2007	JX556139
	A/HABANA/1044/2009	JX556140
	A/HABANA/15824/2010	JX556141
	A/HABANA/15722/2010	JX556142
	A/HABANA/15447/2010	JX556143
	A/HABANA/14840/2010	JX556144
H1N1 estacional	A/HABANA/190/2006	JX556103
	A/HABANA/352/2007	JX556104
	A/HABANA/353/2007	JX556105
	A/HABANA/168/2008	JX556106
	A/HABANA/176/2008	JX556107
	A/HABANA/177/2008	JX556108
	A/HABANA/179/2008	JX556109
	A/HABANA/1156/2009	JX556110
Influenza B	B/HABANA/159/2006	JX556145
	B/HABANA/72/2006	JX556146
	B/HABANA/89/2006	JX556147
	B/HABANA/93/2006	JX556148
	B/HABANA/103/2006	JX556149
	B/HABANA/110/2006	JX556150
	B/HABANA/145/2006	JX556151
H1N1pdm09	A/Habana/289/2009	JX556111
	A/Habana/353/2009	JX556112
	A/Habana/406/2009	JX556113
	A/Habana/1235/2009	JX556114
	A/Habana/1383/2009	JX556115
	A/Habana/2030/2009	JX556116

A/Habana/2177/2009	JX556117
A/Habana/2558/2009	JX556118
A/Habana/2565/2009	JX556119
A/Habana/2566/2009	JX556120
A/Habana/2658/2009	HM176612
A/Habana/2665/2009	HM176613
A/Habana/2666/2009	HM176614
A/Habana/3383/2009	HM159391
A/Habana/3391/2009	HM159392
A/Habana/3469/2009	JX556121
A/Habana/3528/2009	JX556122
A/Habana/3599/2009	HM159393
A/Habana/3617/2009	HM159394
A/Habana/3619/2009	HM159395
A/Habana/3620/2009	HM159396
A/Habana/3626/2009	HM159397
A/Habana/4613/2009	HM159398
A/Habana/4622/2009	HM159399
A/Habana/4677/2009	HM159400
A/Habana/4683/2009	HM159401
A/Habana/4714/2009	HM159402
A/Habana/4725/2009	HM159403
A/Habana/4743/2009	HM159404
A/Habana/5470/2009	HM159405
A/Habana/5483/2009	HM159406
A/Habana/5546/2009	HM159407
A/Habana/5553/2009	HM159408
A/Habana/7374/2010	HQ190930
A/Habana/8232/2010	JX556123
A/Habana/8427/2010	JX556124
A/Habana/9696/2010	JX556125
A/Habana/9765/2010	HQ190931
A/Habana/9790/2010	JX556126
A/Habana/9937/2010	HQ190932
A/Habana/10291/2010	HQ190933
A/Habana/10295/2010	HQ190934
A/Habana/10773/2010	JX556127

A/Habana/10904/2010	JX556128
A/Habana/11106/2010	JX556129
A/Habana/11830/2010	JX556130
A/Habana/11957/2010	JX556131
A/Habana/13628/2010	JX556132

Anexo 7

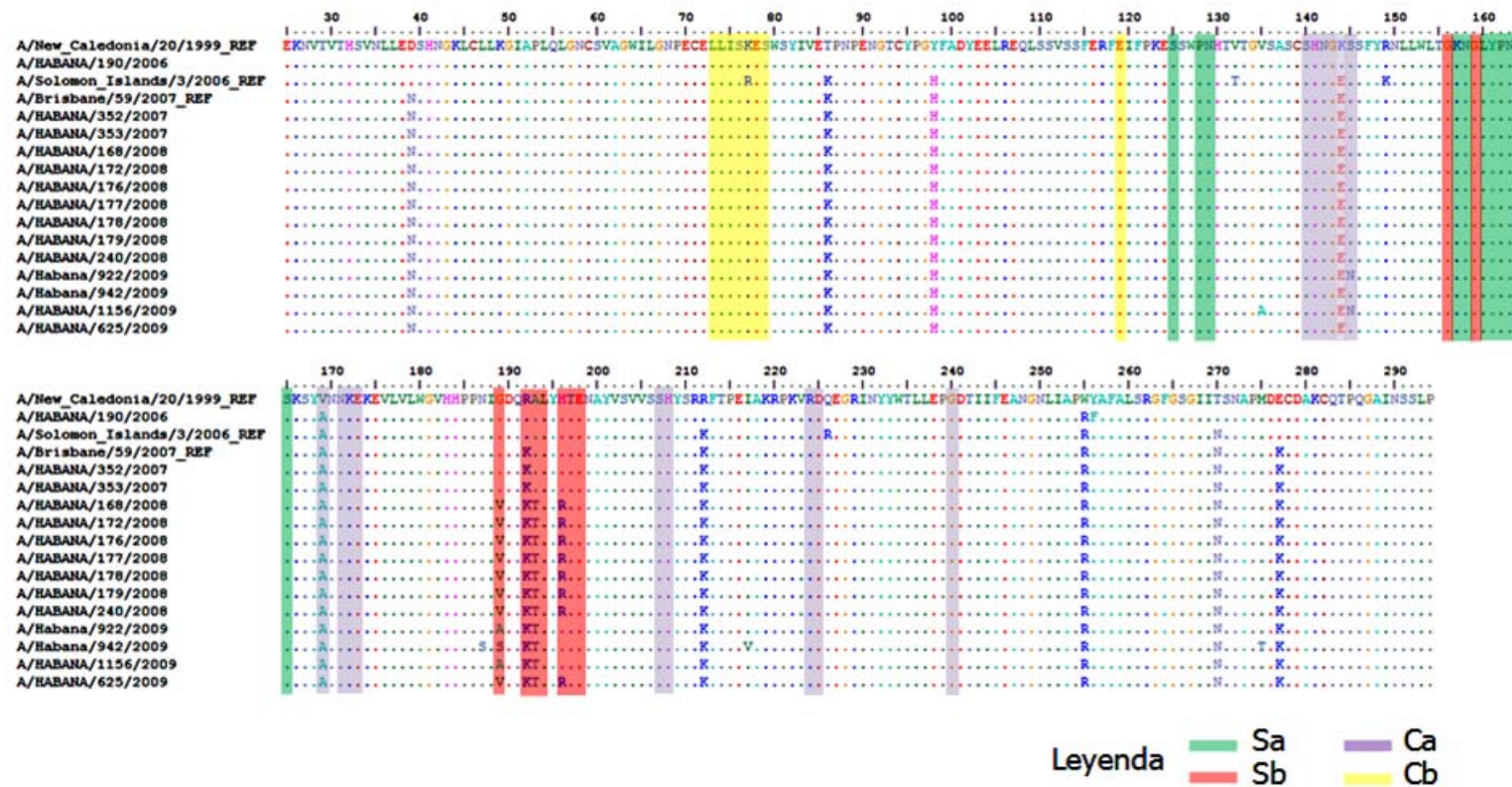
Secuencia de aminoácidos correspondientes a un segmento de la región HA1 la HA del virus influenza A(H3N2). Las secuencias de referencia se denotan con REF. Inmediatamente debajo de cada secuencia de referencia aparecen las secuencias de Cuba.



Los aminoácidos conservados respecto a la secuencia A/Wisconsin/67/2005_REF están representados por puntos. Los rectángulos de diferentes colores delimitan a los aminoácidos mapeados en los sitios antigénicos definidos (A-E).

Anexo 8

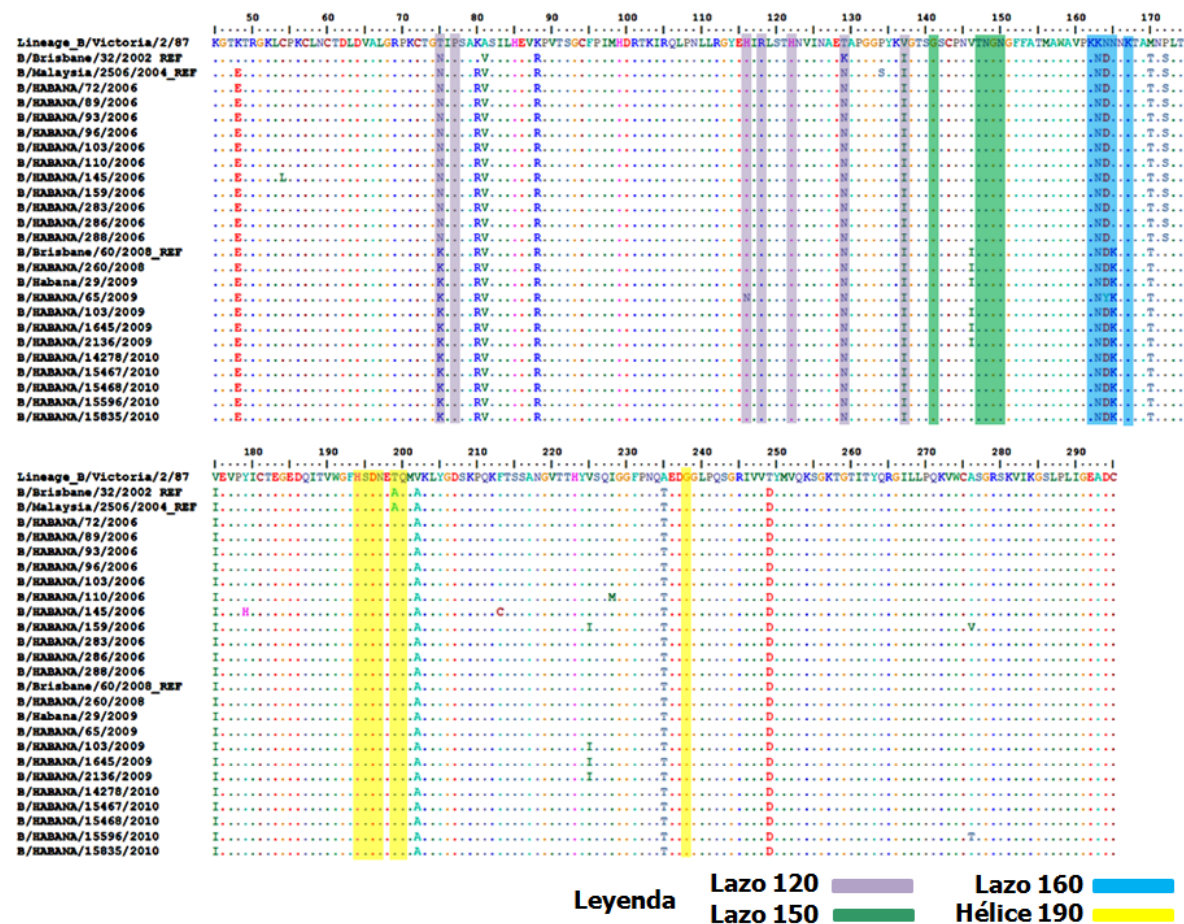
Secuencia de aminoácidos correspondientes a un segmento de la región HA1 la HA del virus influenza A(H1N1) estacional. Las secuencias de referencia se denotan con REF. Inmediatamente debajo de cada secuencia de referencia aparecen las secuencias de Cuba.



Los aminoácidos conservados respecto a la secuencia A/New_Caledonia/20/1999_REF están representados por puntos. Los rectángulos de diferentes colores delimitan a los aminoácidos mapeados en los sitios antigénicos definidos (Sa, Sb, Ca y Cb).

Anexo 9

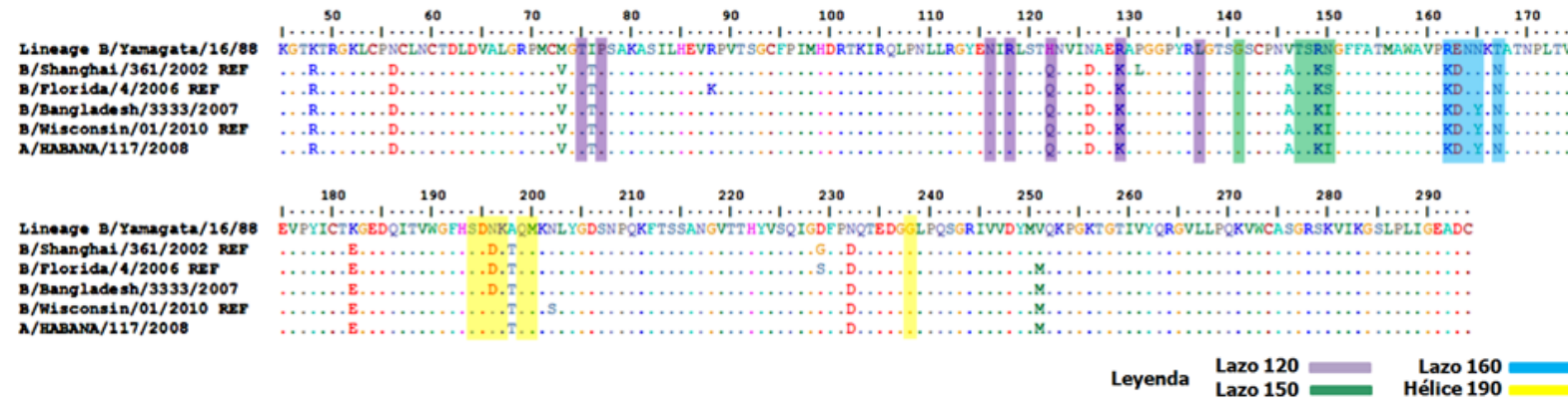
Secuencia de aminoácidos correspondientes a un segmento de la región HA1 la HA del virus influenza B (Linaje B/Victoria/87). Las secuencias de referencia se denotan con REF. Inmediatamente debajo de cada secuencia de referencia aparecen las secuencias de Cuba.



Los aminoácidos conservados respecto a la secuencia que define al linaje B/Victoria/2/1987 están representados por puntos. Los rectángulos de diferentes colores delimitan a los aminoácidos mapeados en los sitios antígenicos definidos (Lazo 120, Lazo 150, lazo 160 y Hélice 190).

Anexo 10

Secuencia de aminoácidos correspondientes a un segmento de la región HA1 la HA del virus influenza B (Linaje B/Yamagata/88). Las secuencias de referencia se denotan con REF. La secuencia de Cuba está representada como A/Habana/117/2008.



Los aminoácidos conservados respecto a la secuencia que define al linaje B/Ymagata/16/1988 están representados por puntos. Los rectángulos de diferentes colores delimitan a los aminoácidos mapeados en los sitios antigénicos definidos (Lazo 120, Lazo 150, lazo 160 y Hélice 190).