



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

INSTITUTO DE CIENCIAS

CENTRO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS MICROBIOLÓGICAS

POSGRADO EN MICROBIOLOGÍA



**EVALUACIÓN DE ANÁLOGOS DEL ÁCIDO
SIÁLICO COMO INHIBIDORES DE LA
REPLICACIÓN DEL VIRUS DE LA
INFLUENZA A**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

- **MAESTRA EN CIENCIAS (MICROBIOLOGÍA)
CON OPCIÓN EN: MICROBIOLOGÍA MÉDICA**

PRESENTA:

CITLALLI PETO VON-DUBEN

ASESORES DE TESIS:

D. en C. Gerardo Santos López

D. en C. Patricia Lozano Zarain

PUEBLA, PUE.

ENERO, 2016

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Ensayos de actividad NA.....	35
Tabla 2. Actividad enzimática obtenida de los sobrenadantes y concentrados para el virus H1N1....	39
Tabla 3. Actividad enzimática obtenida de los sobrenadantes y concentrados para el virus H5N2....	39
Tabla 4. Preparación de los reactivos para el ensayo de NA.	70

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema general de la organización de una partícula del virus de la influenza A.....	13
Figura 2. Estructura cristalina de un monómero de la proteína HA.	14
Figura 3. Estructura cristalina de la proteína NA en vista transversal.	15
Figura 4. Estructura de los inhibidores de NA disponibles comercialmente..	22
Figura 5. Estructura del sitio activo de la NA de la cepa de influenza aviar A H5N2 unido a ácido siálico.....	23
Figura 6. Estructura del sitio activo de la NA de la cepa de influenza aviar A H5N2 unido a zanamivir.	23
Figura 7. Estructura del sitio activo de la NA de la cepa de influenza humana A H1N1 unido a ácido siálico.....	24
Figura 8. Estructura del sitio activo de la NA de la cepa de influenza humana A H1N1 unido a zanamivir.	24
Figura 9. Hidrólisis enzimática de GM3allyl y reacción de inhibición con N-PhAcGM3allyl.	28
Figura 10. A) Estructura de la molécula sialil- α 2,3-lactosa (3SL).	28
Figura 11. Diagrama de trabajo.....	31
Figura 12. Curva de calibración de ácido siálico.....	38
Figura 13. Actividad específica de NA de los concentrados virales H1N1 y H5N2.....	40
Figura 14. Ensayo de actividad de NA. Se muestran diluciones de los concentrados virales H5N2 (A-C) y H1N1 (E-G).....	41
Figura 15. Actividad específica de NA de los virus H1N1 y H5N2 con fetuína como sustrato.	42
Figura 16. A) Actividad de NA específica del virus H1N1 a diferente pH. B) Actividad de NA específica del virus H5N2 a diferente pH.	43
Figura 17. A) Actividad de NA del virus H1N1 a diversas temperaturas. B) Actividad de NA del virus H5N2 a diversas temperaturas.....	44
Figura 18. A) Actividad de NA específica del virus H1N1 por el sustrato 3SL y 6SL. B) Actividad de NA específica del virus H5N2 por el sustrato 3SL y 6SL.	46
Figura 19. Inhibición de la actividad de NA específica de H1N1 por zanamivir.	47

Figura 20. Inhibición de la actividad de NA de H5N2 por zanamivir.....	48
Figura 21. Ensayo de inhibición de la actividad de NA de H1N1 por 3FSL. Se calculó la IC50 con zanamivir = 367.2 nM.....	49
Figura 22. Ensayos de inhibición de la actividad de NA de H5N2 por 3FSL. Se calculó la IC50 con zanamivir = 4792 nM.....	49
Figura 23. Ensayo de inhibición de la actividad de NA de H1N1 por 3FSL.....	50
Figura 24. Ensayos de inhibición de la actividad de NA de H5N2 por 3FSL.....	51
Figura 25. Inhibición de la actividad de NA de H1N1 por 6FSL IC50 = 916.6 nM. IC50 con zanamivir = 367.2 nM.....	52
Figura 26. Inhibición de la actividad de NA de H5N2 por 6FSL IC50=11885 nM. IC50 con zanamivir = 4792 nM.....	52
Figura 27. Ensayo de inhibición de la actividad de NA de H1N1 por 6FSL.....	53
Figura 28. Ensayo de inhibición de la actividad de NA de H5N2 por 6FSL.....	54
Figura 29. Titulación de placas líticas con el virus H1N1.....	55
Figura 30. Titulación de placas líticas con el virus H5N2.....	56
Figura 31. Inhibición de placas líticas de H1N1 por zanamivir.....	57
Figura 32. Inhibición de la formación de placas líticas de la cepa H1N1 por zanamivir. Se calculó la IC50=1128nM.....	58
Figura 33. Inhibición de placas líticas de H5N2 por Zanamivir.....	58
Figura 34. Inhibición de la formación de placas líticas de la cepa H5N2 por zanamivir. Se calculó la IC50= 2.607µM.....	59
Figura 35. Ensayo de inhibición de placas líticas de H1N1 por 3FSL.....	60
Figura 36. Ensayo de inhibición de la formación de placas líticas de la cepa H1N1 por la molécula 3FSL. (a-j). Inhibición por zanamivir (k-l).....	60
Figura 37. Ensayo de inhibición de placas líticas de H5N2 por 3FSL.....	61
Figura 38. Ensayo de inhibición de la formación de placas líticas de la cepa H5N2 por la molécula 3FSL. (a-j). Inhibición por zanamivir (k-l).....	61

ABREVIATURAS

3FSL	5 fenil-sialil- α 2,3-lactosa-alil
6FSL	5 fenil-sialil- α 2,6-lactosa-alil
ARNc	Cadena de RNA complementaria
ARNg	ARN genómico
ARNm	ARN mensajero
DANA	Ácido 2-desoxi-2,3-deshidro-Nacetilneuramínico
DMEM	Medio mínimo esencial modificado de Dulbecco
ECP	Efecto citopático
FANA	Ácido 2-desoxi-2,3-deshidro-N rifluoracetilneuramínico
GalNAc	NAacetilgalactosamina
HA	Hemaglutinina
IC ₅₀	Constante de inhibición al 50%
M1	Proteína de matriz 1
M2	Proteína de matriz 2
MDCK	Madin-Darby canine kidney
NA	Neuraminidasa
NEP	Proteína de exportación nuclear
NP	Nucleoproteína
PA	Proteína polimerasa ácida

PB1	Proteína polimerasa básica 1
PB2	Proteína polimerasa básica 2
PBS	Amortiguador salino de fosfatos
PFU	Unidades formadoras de placas líticas
RNAcs(-)	ARN de cadena sencilla de sentido negativo
RNPs	Ribonucleoproteína
SFB	Suero fetal bovino
3SL	Sialil- α 2,3-lactosa
6SL	Sialil- α 2,6-lactosa

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	10
GENERALIDADES.....	10
CLASIFICACIÓN	10
VARIACIÓN GENÉTICA DE LOS VIRUS DE LA INFLUENZA.....	12
CARACTERÍSTICAS ESTRUCTURALES.....	12
Hemaglutinina	14
Neuraminidasa	15
ANTECEDENTES.....	18
ANTIVIRALES.....	18
Oseltamivir	20
Zanamivir.....	20
Otros inhibidores.....	25
RESISTENCIA A INHIBIDORES DE NEURAMINIDASA	25
ANÁLOGOS DEL ÁCIDO SIÁLICO	26
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	29
JUSTIFICACIÓN	29
HIPÓTESIS.....	29
OBJETIVOS	30
DIAGRAMA DE TRABAJO.....	31
MATERIAL Y MÉTODOS	32
CÉLULAS.....	32
VIRUS.....	32
Inoculación de cultivos celulares y producción del sobrenadante viral	32
Concentración viral:	33
MEDICIÓN DE ACTIVIDAD DE NEURAMINIDASA.....	33
Ensayo de actividad de neuraminidasa.....	33

Actividad de neuraminidasa viral a diferente pH.....	34
Actividad de neuraminidasa viral a diferentes temperaturas.....	34
Actividad de neuraminidasa viral con diferentes sustratos.....	34
Ensayo de inhibición de la actividad de neuraminidasa.....	34
Curva de ácido siálico	36
Cuantificación de proteína (Método de Bradford)	36
CUANTIFICACIÓN DE PLACAS LÍTICAS	36
Cuantificación de virus en los sobrenadantes de las células infectadas mediante el método de placas líticas.....	36
Infeción de las células MDCK.....	37
Ensayo de inhibición de la formación de placas líticas	37
RESULTADOS	38
RELACIÓN ÁCIDO SIÁLICO Y ACTIVIDAD DE NEURAMINIDASA	38
CONCENTRADOS VIRALES	38
ACTIVIDAD DE NEURAMINIDASA SOBRE FETUÍNA COMO SUSTRATO.....	42
ACTIVIDAD DE NEURAMINIDASA A DIFERENTE pH.....	43
ACTIVIDAD DE NEURAMINIDASA A DIFERENTE TEMPERATURA.....	44
ACTIVIDAD DE NEURAMINIDASA SOBRE EL SUSTRATO SIALIL α 2,6 LACTOSA.....	45
ENSAYO DE INHIBICIÓN DE LA ACTIVIDAD DE NEURAMINIDASA POR LA MOLÉCULA 5FENIL SIALIL α 2,3 LACTOSA ALIL	48
ENSAYO DE INHIBICIÓN DE ACTIVIDAD DE NEURAMINIDASA CON LA MOLÉCULA 5FENIL SIALIL α 2,6 LACTOSA ALIL	51
INHIBICIÓN DE PLACAS LÍTICAS POR EL INHIBIDOR ZANAMIVIR	57
ENSAYOS DE INHIBICIÓN DE PLACAS LÍTICAS POR EL INHIBIDOR 5FENIL SIALIL α 2,3 LACTOSA ALIL	59
.....	60
DISCUSIÓN	62
CONCLUSIONES	68
PERSPECTIVAS	69

ANEXOS.....	70
REFERENCIAS.....	73

RESUMEN

La influenza A es un problema importante de salud global que puede llegar a provocar grandes pandemias. La estructura del virus de influenza A se caracteriza por tener en su envoltura proteínas indispensables para la entrada y salida de la célula. Una de las proteínas más importantes del virus es la neuraminidasa (NA), la cual se considera un factor de virulencia. La hemaglutinina (HA) es la proteína que reconoce al receptor celular, que es el ácido siálico. Durante la salida del virus la hemaglutinina puede unirse nuevamente a los residuos de ácido siálico que se encuentra en la terminal de las glicoproteínas de la superficie celular, cuando esto sucede, la neuraminidasa escinde el ácido siálico y con esto permite al virus diseminarse e infectar otras células así como también le permite difundir en la mucina del tracto respiratorio. El ácido siálico puede unirse al carbono tres o seis de la galactosa formando un enlace α -2,3 o α -2,6 en las células epiteliales de la tráquea en humanos predomina el enlace α -2,6 y en el epitelio pulmonar de las aves el α -2,3. A diferencia de la hemaglutinina, la NA no ha sido estudiada suficientemente en su especificidad y su papel en los saltos de especie. El conocimiento del ciclo viral y los procesos claves de la replicación del virus, nos permiten visualizar blancos para la terapia antiviral y en el caso del virus de influenza A uno de estos blancos es la enzima neuraminidasa, pues al bloquear su acción bloqueamos la diseminación viral. Muchos inhibidores de este virus han sido probados, incluyendo los adamantanos o inhibidores del canal proteico M2; sin embargo, estos inhibidores han sido descontinuados debido a la resistencia que generan rápidamente. Los únicos inhibidores actualmente recomendados por la OMS son los inhibidores de la neuraminidasa, como zanamivir y oseltamivir. En el laboratorio de Química y Biotecnología de Oligosacáridos del Centro de Investigación en Macromoléculas Vegetales (CERMAV-CNRS Francia) se diseñaron y sintetizaron dos moléculas con probable actividad antiviral 3FSL y 6FSL las cuales fueron probadas en este trabajo, además se realizó la producción de dos moléculas sialiladas que pueden ser usadas como sustratos de la enzima neuraminidasa: 3SL y 6SL. Se utilizaron dos cepas del virus de influenza A que se cuentan en el laboratorio de Virología del Centro de Investigación Biomédica de Oriente (CIBIOR-IMSS), la cepa H1N1 Puerto Rico de influenza humana A/Human/PuertoRico/8/1934 y la cepa A/Chicken/México/31381-7/1994 de influenza aviar. Para probar la inhibición de la replicación viral se realizaron dos metodologías: Los ensayos de inhibición de la actividad

neuraminidasa y la inhibición de la formación de placas líticas. Lo primero que se hizo fue establecer las condiciones ideales de reacción de la enzima neuraminidasa con el ácido siálico, para esto se midió la actividad de neuraminidasa a distintas temperaturas y pH, posteriormente se probaron las moléculas 3SL y 6SL como sustratos de la enzima para evaluar la especificidad por los enlaces α -2,3 y α -2,6 de las cepas antes mencionadas, encontrando que la NA del virus humano (H1N1) presenta esencialmente actividad sobre 6SL, mientras que sobre 3SL no observamos actividad, lo cual sugiere que la neuraminidasa de nuestra cepa no tiene la capacidad de escindir este tipo de enlace. Por otro lado observamos que la NA del virus aviar (H5N2) tiene actividad con ambos sustratos, pero presenta una preferencia por el sustrato 3SL. Los resultados en cuanto a preferencia por los sustratos 6SL y 3SL por el virus H1N1 y H5N2 respectivamente, coinciden con el tipo celular al que infectan; humano y aviar, lo cual es importante en la investigación de estos virus, pues nos permiten saber de qué manera puede actuar un inhibidor en cuanto al tipo de enlace. Los ensayos de inhibición de la neuraminidasa no resultaron ser positivos, pues la molécula 3FSL no causó inhibición de la actividad de neuraminidasa para la cepa H1N1 ni para la cepa H5N2. La molécula 6FSL causó una ligera inhibición en ambas cepas pero dicha inhibición no fue mayor a la encontrada, en el control de inhibición zanamivir. En cuanto a la inhibición de la infección en cultivo celular, no se logró obtener una reducción de la formación de placas líticas utilizando la molécula 3FSL.

INTRODUCCIÓN

GENERALIDADES

Los virus son agentes importantes de muchas enfermedades humanas, las cuales afectan el bienestar de las sociedades, perturbando la salud y la economía, por ello es necesario entender la naturaleza de los virus, cómo se replican y cómo causan enfermedad. Este conocimiento permite el desarrollo de medios eficaces para la prevención, el diagnóstico y tratamiento de enfermedades virales a través de la producción de vacunas y medicamentos antivirales. La lucha contra las enfermedades virales ha sido, y sigue siendo, un importante desafío en el campo de desarrollo de fármacos (Cox y Subbarao, 2000).

Uno de los problemas que representa el tratamiento de las enfermedades virales es que, los virus al ser parásitos intracelulares utilizan la maquinaria de la célula hospedera para su replicación y liberación. Por lo tanto, es difícil atacar y destruir la partícula viral sin perturbar las funciones esenciales de la célula hospedera. Una de las enfermedades virales más comunes y que se tiene registros desde la edad media es la influenza (del Campo, 2006).

CLASIFICACIÓN

Los virus de la influenza pertenecen a la familia *Orthomyxoviridae*. Los miembros de esta familia se caracterizan por tener genomas segmentados y, su replicación ocurre en el núcleo celular. Esta familia incluye los géneros *Influenzavirus A*, *Influenzavirus B*, *Influenzavirus C*, *Isavirus*, *Quarantavirus* y *Thogotovirus* (Adams et al., 2013). Los virus de esta familia se caracterizan por ser envueltos y tener genoma de cadena sencilla de ARN de sentido negativo (ARNcs[-]) (Palese y Shaw 2007).

Los tres tipos de influenza se distinguen por la especificidad de infección en las distintas especies de animales y su patogenicidad. La clasificación de los virus de la influenza en los tipos A, B y C se basa en las características antigénicas de dos de sus proteínas internas; la proteína de matriz y la nucleoproteína; la posterior división en los subtipos se realiza según

las características antigénicas de sus proteínas de superficie; hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (NA).

Los virus de la influenza B y C se han aislado casi exclusivamente en humanos (Wright *et al.*, 2012). El virus de la influenza B sólo existe en un subtipo y puede provocar epidemias serias con alta mortalidad en ancianos, sin embargo no ha ocurrido un amplio rango de pandemias por influenza B como es el caso de influenza A, por lo que el virus de la influenza B tiene menor atención para su control. Influenza C no es un patógeno humano grave y se ha estudiado en menor proporción (Strauss y Strauss, 2007). Aunque las tres especies de influenza infectan a los humanos, la más notable es la A, ya que presenta más variabilidad, por lo que es causa de epidemias con significativa mortalidad y mayor potencial pandémico (Taubenberger y Kash, 2010).

Para la virología, es importante entender el virus de influenza no sólo como patógeno, sino también como una entidad que forma parte de un ecosistema, pues junto con la adaptación a nuevos hospederos también se limita la capacidad de estos virus para retornar a su reservorio natural (Swayne, 2007). El virus de la influenza A infecta un amplio espectro de aves y mamíferos como humanos, cerdos, caballos, ballenas, lobos de mar, camellos, entre otros. Las aves acuáticas sirven como reservorio natural de todos los subtipos conocidos de influenza A y probablemente son la fuente de las cepas pandémicas (Webster *et al.*, 1992), pero como hospederos naturales, no hay signos de infección, mientras que otras especies de aves y mamíferos se afectan con síntomas que van desde muy leves hasta muy severos (Stallknecht y Shane 1988). Los patos pueden excretar el virus en las heces durante semanas, e infectar a otros patos a través del agua contaminada. La alimentación y el comportamiento social de las especies hospederas es un determinante para la propagación del virus (Ellstrom *et al.*, 2008). Los brotes de gripe aviar son a menudo difíciles de controlar ya que el virus puede persistir y permanecer activo durante algún tiempo en la población. En áreas con poblaciones densas de aves de corral o recursos limitados para la vigilancia y el control, como en México, los brotes son aún más difíciles de contener (Wahlgren, 2011).

VARIACIÓN GENÉTICA DE LOS VIRUS DE LA INFLUENZA

El complejo de polimerasas del virus de la influenza no tiene una alta fidelidad a diferencia de la ADN polimerasa de su hospedero, lo cual genera una alta proporción de mutaciones en el genoma viral durante la replicación (Chen y Holmes, 2006). Las mutaciones en los aminoácidos de las regiones antigénicas de las proteínas HA y NA pueden inducir que las nuevas cepas virales puedan evadir la inmunidad pre-existente, a este fenómeno se le denomina deriva antigénica (Scholtissek *et al.*, 1978; Garten *et al.*, 2009). Además, HA y la NA también pueden evadir el sistema inmunitario por reordenamiento de sus segmentos, proceso mediante el cual los virus adquieren una HA o una NA de un nuevo subtipo por recombinación genética con otro virus de la influenza A. Este último mecanismo ha sido el principal factor para la generación de pandemias de influenza. Tal efecto se pudo observar durante la pandemia de influenza A H1N1 en 2009, en la que a pesar de que en muchos casos se restringieron las fronteras de países con brotes, la diseminación finalmente se dio en todo el mundo. Cada 10-20 años aproximadamente, surge un nuevo virus por reordenamiento. A lo largo de los últimos 120 años el virus de la influenza ha provocado 5 pandemias dejando millones de muertos en todo el mundo (1889, 1918, 1957, 1968, y 2009) (Taubenberger y Morens, 2009). Se admite que la reaparición de antiguos subtipos podría ser coincidente con la desaparición, por fallecimiento después de los 70-80 años de muchas personas que estaban inmunizadas frente a aquéllos. Y también se podría encontrar de este modo una explicación a las similitudes encontradas entre los virus de 1889, 1957, y 1968 (Dugan *et al.*, 2008; Holmes *et al.*, 2005).

CARACTERÍSTICAS ESTRUCTURALES

Las partículas virales de la influenza son pleomórficas con un tamaño de 80 a 120 nm de diámetro, están compuestas por aproximadamente 1 % de RNA, 70 % de proteínas, 20 % de lípidos y entre 5 a 8 % de carbohidratos. La estructura del virus de la influenza A se caracteriza por tener una envoltura de la cual sobresalen glicoproteínas en forma de espigas, que son conocidos como hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (NA), aproximadamente en una proporción de 4:1 o de 5:1, alrededor de 500 espículas radiales de HA y 100 de NA

(Lamb y Krug, 2001). Estas glicoproteínas son proyectadas de una membrana lipídica derivada de la célula hospedera. A su vez, un pequeño número de canales iónicos atraviesan la envoltura lipídica, éstos están formados por la proteína de matriz 2 (M2) esta proteína se encuentra en una proporción con HA de 1:102. Las tres proteínas integrales de membrana; HA, NA, y M2 se encuentran insertadas en la envoltura viral, la cual en la parte interna posee a una capa de proteína de matriz 1 (M1), que a su vez envuelve la nucleocápside del virus. La nucleocápside consta del ARN genómico (ARNg) viral recubierto con muchas subunidades de nucleoproteína (NP) (Carter y Saunders, 2007) (Figura 1).

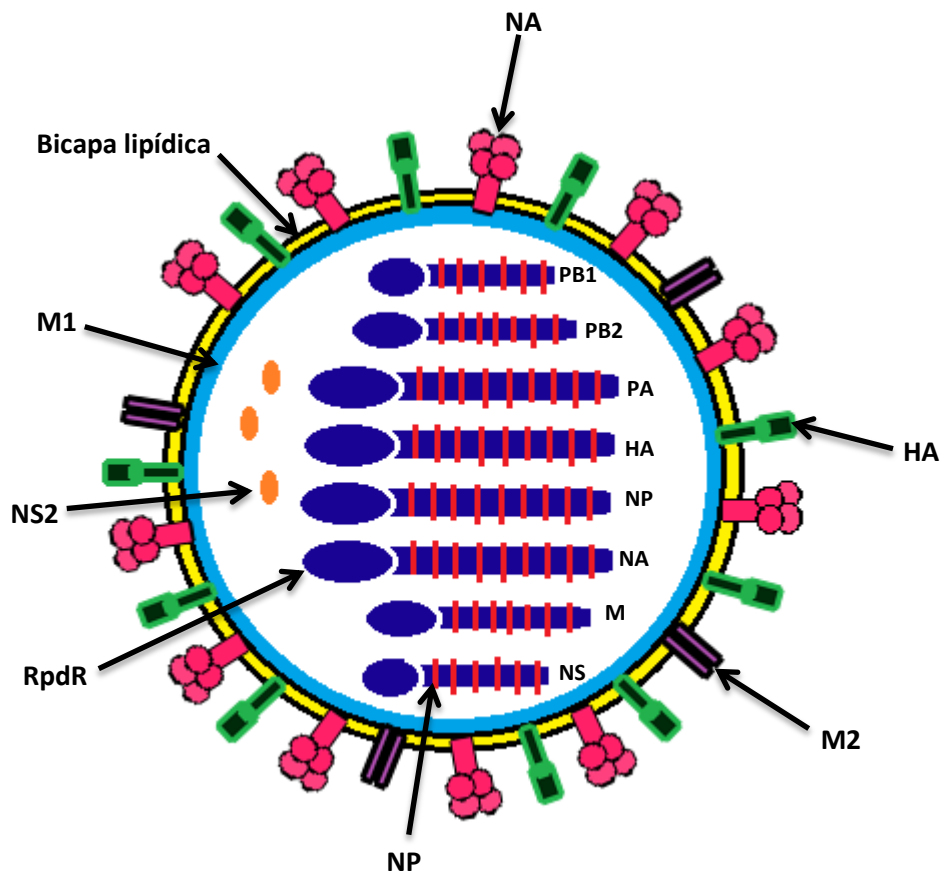


Figura 1. Esquema general de la organización de una partícula del virus de la influenza A. La imagen fue recreada de Salazar *et al.*, 2010.

El genoma del virus de la influenza A está constituido por ocho segmentos de -RNAs con un total de 14 kb. El virus de la influenza A produce diez proteínas a partir de los ocho segmentos. Entre ellas se encuentran las proteínas no estructurales producidas por el segmento ocho, denominados: NS1 y NS2; las proteínas de matriz M1 y M2, que son producto del segmento siete; la proteína NA producto del segmento seis; la NP producto del segmento cinco; la proteína HA producto del segmento cuatro y, las proteínas del complejo con actividad de polimerasa: proteína polimerasa ácida (PA), proteína polimerasa básica 1 (PB1) y proteína polimerasa básica 2 (PB2) producto de los segmentos tres, dos y uno respectivamente (Cann, 2005).

Hemaglutinina

La HA es una proteína de membrana tipo I, que consiste de estructuras conservadas, incluyendo un péptido señal, el dominio citoplasmático, el dominio transmembrana y el dominio extracelular. Es un trímero constituido por dos regiones estructurales distintas, un tallo constituido por una triple cadena de alfa hélices enrolladas y una cabeza globular de hojas beta plegadas antiparalelas. La cabeza contiene el sitio de unión al receptor el cual está rodeado por determinantes antigénicos variables. Los anticuerpos anti HA pueden neutralizar la infección viral; sin embargo, los virus suelen evolucionar por deriva antigénica



Figura 2. Estructura cristalina de un monómero de la proteína HA. Representación de listones. Imagen tomada de PDB. Código: 2VIU.

cambiando los aminoácidos del sitio antigénico, pero las estructuras de tallo y cabeza

permanecen conservadas entre las cepas. Se han encontrado 18 variantes antigénicas de HA, las cuales son denominadas subtipos (Sun *et al.*, 2013).

Neuraminidasa

La NA es una glicoproteína de membrana integral tipo II, es un homotetrámero en forma de seta anclado a la envoltura viral que consiste de 4 partes, el tallo citoplasmático, el dominio de tallo, el dominio transmembranal, y el dominio globular (Kundu *et al.*, 1996). Es una esterasa que escinde el ácido siálico terminal de las glicoproteínas de la superficie celular permitiendo la liberación de los viriones y evitando la agregación de partículas virales nacientes. La NA también elimina los residuos de ácido siálico de la envoltura del virus. Se han encontrado 11 subtipos de NA (Sun, 2013). La NA además puede contribuir a acrecentar la concentración de plasminógeno; un precursor de una proteasa que favorece la acción hidrolítica necesaria para el funcionamiento de la HA (Goto y Kawaoka, 1998). Las funciones complementarias entre la unión de HA al ácido siálico y su remoción por NA requiere de una coadaptación evolutiva (Taubenberger y Kash, 2010).

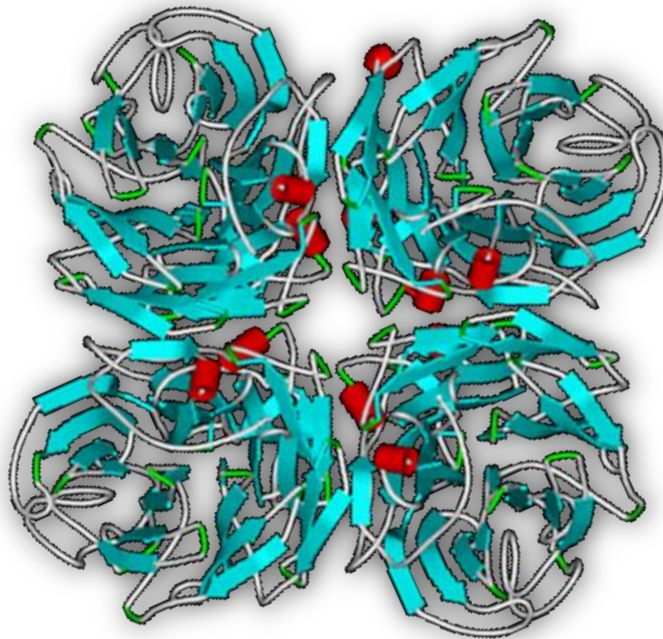


Figura 3. Estructura cristalina de la proteína NA en vista transversal. Representación de listones. Se pueden observar los 4 sitios activos del tetrámero. Imagen tomada de PDB. Código: 2HTY.

CICLO DE REPLICACIÓN

Los virus de la influenza tienen afinidad por el tracto digestivo o por el tracto respiratorio, el dominio de unión al receptor reconoce un ácido siálico en la superficie de la célula hospedera. El ácido siálico es un monosacárido de nueve carbonos unido covalentemente en la parte terminal de muchos glicoconjugados de varios tipos celulares. Generalmente el grupo amino del carbono 5 está N-acetilado (Tiralongo y Martinez-Duncker, 2013). El carbono 2 del ácido siálico puede unirse al carbono tres o seis del penúltimo azúcar (galatosa o NAcetilgalactosamina [GalNAc]) formando un enlace α -2,3 o α -2,6, este reconocimiento es esencial para la endocitosis (Viswanathan *et al.*, 2010; Yamada *et al.*, 2006). En las células epiteliales de la tráquea en humanos predomina el enlace α -2,6 y en el epitelio pulmonar de las aves el α -2,3. En humanos el enlace α -2,3 también está presente pero en menor cantidad, es por eso que existe la posibilidad de infectarnos por virus de la influenza aviar. Los virus de influenza adaptados a la aves tienen una unión específica por ácido siálico α 2,3 mientras la HA de los virus adaptados a humanos tienen una alta especificidad por enlaces de ácido siálico α 2,6. Los cerdos que son frecuentemente infectados por la influenza A también son susceptibles tanto a las cepas humanas y aviarias, lo que puede explicarse por el hecho de que en el epitelio respiratorio de los cerdos presentan ácido siálico tanto en α 2,3 como en α 2,6 (Korteweg y Gu, 2008).

Los sitios activos de la HA del virus de la influenza A se unen a ácido siálico por su carga negativa (Tiralongo y Martinez-Duncker, 2013), formando puentes de hidrógeno. La interacción del virus de la influenza con ácido siálico es de baja afinidad; sin embargo, las interacciones de múltiples residuos de ácido siálico con numerosas moléculas de HA logran una alta afinidad conjunta. El ácido siálico se une a la HA mediante puentes de hidrógeno a la treonina 125 y 126, a la serina 127, y a la tirosina 88 (Yu *et al.*, 2004). Una vez que la HA reconoce al ácido siálico, se despliega y expone el interior de la subunidad HA2 en el ambiente ácido, entonces los péptidos de fusión en HA2 se insertan dentro de la membrana hospedera (Gagneux *et al.*, 2003; Sammalkorpi y Lazaridis 2007). La proteína M2 modifica el pH por la entrada de iones hidrógeno para activar la fusión membranar; el pH ácido del compartimento endosomal permite un cambio conformacional en la HA madura, la cual es un

trímero y cada monómero se somete a una escisión proteolítica por una serín proteasa que reconoce un motivo conservado Q/E-X-R que se encuentra en el sitio de corte de la HA (Chen *et al.*, 1998). La activación por la división de HA requiere de proteasas similares en el intestino de aves y en las células respiratorias, de esta manera se forman enlaces disulfuro en las cadenas polipeptídicas generando las fracciones HA1 y HA2. NS2 (también llamada proteína de exportación nuclear [NEP]) facilita la exportación nuclear del complejo de ribonucleoproteína (RNP) (Wise *et al.*, 2009).

Los segmentos de ARNg se encuentran enrollados alrededor de monómeros de NP y son empacados como RNPs, con las tres proteínas polimerasas formando un heterotrímero unido a una estructura corta en forma de horquilla constituida por ARN. Durante la replicación PB1 funciona como ARN polimerasa dependiente de ARN. La ARN polimerasa sintetiza dos cadenas positivas; una funciona como ARN mensajero (ARNm) para la síntesis de proteínas virales y la otra denominada cadena de ARN complementaria (RNAC) funciona como molde para la replicación de RNAg. La función de PB2 en la síntesis del RNAm es unir la capucha del RNAm del hospedero al RNA viral, mientras PA es necesaria para formar el complejo funcional de la polimerasa, aunque también puede tener una actividad proteolítica adicional y puede actuar como factor de alargamiento durante la síntesis del ARN. Por su parte la proteína NS1 funciona potenciando el transporte de ARNm, inhibiendo el procesamiento del ARNm del hospedero y como antagonista del interferón de tipo I (Hale *et al.*, 2008).

La existencia de N-glicosilación es necesaria para las glicoproteínas membranales del virus ya que codifican información crucial que afecta la sensibilidad de la HA a la temperatura, da protección a los sitios de corte, e influye en el plegamiento, la maduración, el transporte y la degradación de las glicoproteínas HA y NA. Además la N-glicosilación en proteínas de la envoltura viral puede proporcionar glicanos idénticos a los de las células del huésped para enmascarar los sitios antigénicos. Dos sitios de glicosilación que están notablemente conservados en todos los subtipos de HA se encuentran en el sitio de corte y en el péptido de fusión. Dos a cuatro sitios de glicosilación se encuentran ubicados en el dominio de tallo y en el dominio globular de la NA.

La biosíntesis y modificación de las proteínas nacientes ocurre en el retículo endoplásmico y aparato de Golgi, los residuos glicosilados contienen información crucial para el plegamiento, maduración, transporte o degradación de proteínas. Adicionalmente, la glicosilación también impacta la sensibilidad de la HA a la temperatura, los sitios de corte, y la preferencia de unión al receptor. (Nicholls, 2008). Las glicoproteínas de los virus de la influenza sólo tienen residuos N-glicosilados (Wagner *et al.*, 2001). Para escapar de la respuesta humoral y celular, las proteínas de la envoltura viral pueden estar provistas de glicanos idénticos a los de la célula hospedera y enmascarar los sitios antigénicos (Sun *et al.*, 2011).

El ensamble de los viriones es un proceso selectivo, los segmentos de ARN viral tienen señales de empaquetamiento que aseguran la incorporación del genoma completo, posteriormente junto con las proteínas de matriz y de envoltura se acumulan en la bicapa lipídica hasta que se da la liberación de la partícula viral por la acción de la proteína NA (Strauss & Strauss, 2007).

ANTECEDENTES

ANTIVIRALES

La evidencia que respalda que un compuesto interfiera con la replicación de un virus incluye la inhibición de su efecto citopático (ECP), inhibición de su actividad enzimática o de formación de placas líticas. (Krauss *et al.*, 2012). Hay pocos compuestos que interfieren con las actividades virales sin causar un daño a la célula; sin embargo hay muchas actividades específicas de los virus que son objetivos potenciales de drogas. Se han desarrollado vacunas para el tratamiento de algunas enfermedades virales, no obstante para algunas de las principales y más comunes no ha sido posible producir vacunas con la eficacia suficiente como es el caso del virus de la influenza A (Horimoto y Kawaoka, 2005) ya que las mutaciones puntuales, el reordenamiento de sus segmentos génicos o la administración de un antiviral pueden provocar la resistencia (Landolt y Olsen, 2007). Estos cambios son difíciles de predecir y en la población suelen circular varios subtipos de influenza A, es por ello que la vacuna debe ser reformulada cada año (Ong y Hayden, 2007).

Dos clases de antivirales se utilizan para el manejo de infecciones por influenza: los adamantanos y los inhibidores de la NA. Los adamantanos son bloqueadores del canal M2; amantadina y rimantadina se desarrollaron en 1960 y se aprobaron desde entonces en muchos países. Debido a su actividad únicamente contra la influenza A, a sus efectos adversos y su rápida emergencia de resistencia tanto durante el tratamiento como en su ausencia, no se recomienda el uso de estas drogas en la actualidad. Desde el 2010 los inhibidores de la NA son la única clase de antivirales recomendados por la OMS para el tratamiento y profilaxis de las infecciones de influenza A y B (Pizzorno y Boivin 2011).

Desde 1970 la idea de inhibir la función de NA resultaba atractiva e inicialmente se ensayó como posible inhibidor el producto de la reacción, es decir; el ácido N-acetilneuramínico, sin embargo resultó poco práctico debido al carácter reversible del proceso y el rápido catabolismo del producto. Posteriormente en 1974 se obtuvieron buenos resultados en cuanto a inhibición, en cultivos celulares utilizando un análogo estructural del compuesto correspondiente al estado de transición de la reacción enzimática. Dicho análogo es el ácido 2-desoxi-2,3-deshidro-N-acetilneuramínico, también denominado Neu5Ac2en o DANA, sin embargo al ser excretado con excesiva rapidez, DANA no producía los efectos inhibidores deseados (Meindl *et al.*, 1974). En 1976 Palese y colaboradores consiguieron incrementar el efecto inhibidor con el derivado fluorado de DANA: el ácido 2-desoxi-2,3-deshidro-N-rifluoracetilneuramínico (FANA). Probablemente, éste ha sido el compuesto con mayor actividad inhibidora encontrado. Pero su toxicidad y su falta de actividad *in vivo* impidieron su aplicación (Palese y Compans 1976).

En 1983 después de su cristalización se conoció la estructura tridimensional de la NA del virus de la influenza A, reconociendo la composición de los aminoácidos del sitio activo y sus zonas próximas (Colman *et al.*, 1983). El sitio catalítico de la NA se alineó secuencial y estructuralmente en 1993 por Colman y colaboradores y se encontró que está constituido por ocho residuos funcionales (R-118, D-151, R-152, R-224, E-276, R-292, R-371, Y-406) rodeados por once residuos (E-119, R-156, W-178, S-179, D-198, I-222, E-227, H-274, E-277, N-294, E-425) implicados en la estabilización de la estructura del sitio activo (Colman, *et al.*, 1993). A partir de este descubrimiento se han podido diseñar racionalmente compuestos

que se unan a la hendidura del sitio activo actuando como inhibidores de la NA, por lo que los viriones no pueden ser liberados de los receptores de ácido siálico y se agregan en la superficie celular infectada dificultando la liberación y la infección a otras células. (von Itzstein *et al.*, 1993).

Un aspecto importante es que la profunda cavidad que constituye el sitio activo de la enzima contiene aminoácidos que son conservados en las neuraminidasas de todas las cepas de virus de la gripe A y B que han sido caracterizadas hasta la fecha, algunos de estos aminoácidos no se unen al ácido siálico, sino que proveen una estructura de andamio que sostiene a otros aminoácidos que sí contactan con el carbohidrato y por tanto constituyen un blanco atractivo para la terapia antiviral (von Itzstein *et al.*, 1993).

Dos inhibidores de NA son comúnmente aceptados a nivel mundial para los usos terapéuticos y profilácticos: el agente oral fosfato de oseltamivir, comercializado como *Tamiflú* (Roche) y el fármaco inhalado zanamivir comercializado como *Relenza* (GSK). En 2009 se autorizó en EUA el uso de peramivir comercializado como *Peramiflú* para el tratamiento de influenza A (H1N1) para pacientes hospitalizados. Todos los inhibidores de la NA se basan en la estructura del análogo DANA (Samson *et al.*, 2013).

Oseltamivir

El oseltamivir [ácido-4-Acetilamino-5-amino-3-(1-etilpropoxi)-1-ciclohexen-1-carboxilato de etilo] se desarrolló a través de modificaciones de análogos del ácido siálico, incluyendo la adición de una cadena lipofílica que permite a la droga ser administrada oralmente, es activado al ser carboxilado por esterasas hepáticas. Este compuesto actúa como un inhibidor competitivo (Kim *et al.*, 1998). Debido a la larga cadena hidrofóbica del oseltamivir la NA sufre rearrreglos para unirse al inhibidor; el aminoácido E276 rota y se une a R-224 (Collins *et al.*, 2008). Las mutaciones que afecten este rearrreglo pueden reducir la afinidad de la unión a oseltamivir y por lo tanto inducir resistencia (Wang *et al.*, 2002).

Zanamivir

El zanamivir [ácido-4-guanidín-2-desoxi-2,3-deshidro-*N*-acetilneuramínico] se aprobó como un agente anti influenza en 1999 pero debido a su pobre biodisponibilidad oral, zanamivir fue formulado como un inhalador. La estructura molecular de zanamivir incluye un grupo guanidino, en lugar del grupo amino que se encuentra en oseltamivir. El grupo guanidino del zanamivir interactúa con el residuo E119 conservado en las NA.

El ácido siálico se une mediante sus grupos carboxilato y glicerol a algunos aminoácidos del sitio activo de la enzima, aunque no llegue al fondo de la cavidad. El zanamivir lo hace igualmente, pero además refuerza esta unión efectuándola mediante el voluminoso grupo guanidino, dotado de carga positiva, que le permite enlazarse a los aminoácidos de carga negativa situados en lo más profundo de la oquedad del sitio activo. La resistencia a zanamivir puede desarrollarse como resultado de mutaciones en los residuos del sitio catalítico de la NA afectando la unión entre la enzima y el inhibidor (Gubareva, 2000).

Determinaciones de la inhibición enzimática han confirmado que los derivados 4-amino y 4-guanidino del Neu5Ac2en son inhibidores de alta afinidad de la NA de los virus de la influenza. Son eficaces frente a virus influenza A y B. Son inhibidores significativamente más potentes que cualquier otro descrito anteriormente ya que se unen al sitio activo de la enzima con más intensidad que lo hacen el ácido *N*-acetilneuramínico y otros análogos estructurales (von Itzstein *et al.*, 1993)

En los dos casos anteriores, el grupo hidrófobo contribuye a su unión con ciertas zonas del sitio activo quedando unidos al sitio activo de la NA, lo hacen tanto el zanamivir como el oseltamivir con mayor intensidad que lo haría el propio producto de la reacción aunque no lo hagan implicando exactamente a los mismos aminoácidos del sitio activo (Laver *et al.*, 1999).

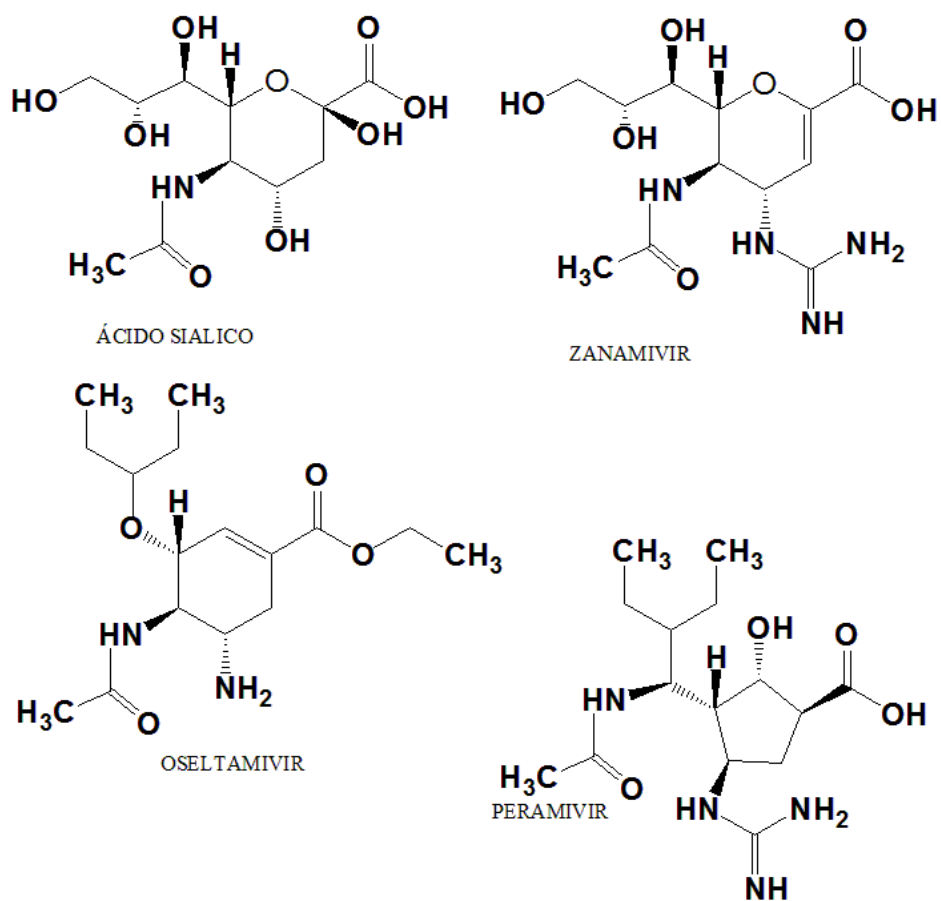


Figura 4. Estructura de los inhibidores de NA disponibles comercialmente. La comparación de las fórmulas estructurales de estos cuatro compuestos permite comprobar la gran similitud existente entre el zanamivir y los dos últimos. Peramivir comparte con zanamivir la presencia en su molécula del grupo guanidino, y con el oseltamivir la cadena lateral lipófila, difiriendo de ambos por contener un ciclopentano en lugar de los anillos hexagonales de éstos. La imagen fue realizada con el programa Chemdraw.

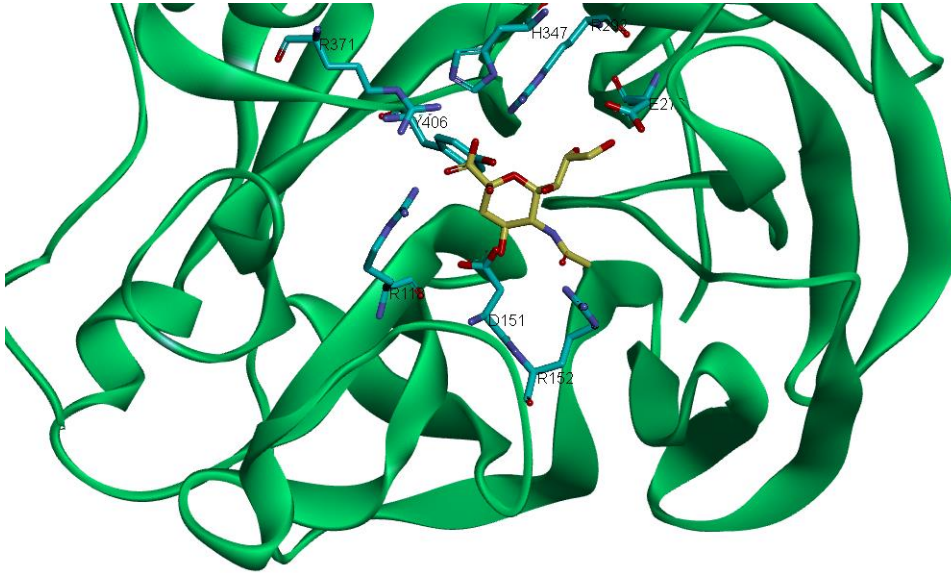


Figura 5. Estructura del sitio activo de la NA de la cepa de influenza aviar A/Chicken/Mexico/31381-7/1994 H5N2 unido a ácido siálico. Los aminoácidos del sitio activo a los que se une el ácido siálico son: R118, D151, R152, E276, R292, P327, R371 y Y406. La secuencia se tomó de GenBank (acceso: AY497121). Las secuencias se alinearon con el programa Clustal Omega a partir de una N2 (PDB: 4GZQ) y las mutaciones se introdujeron en el programa Swiss PDB Viewer. La visualización con ácido siálico se realizó en el programa Discovery Studio.

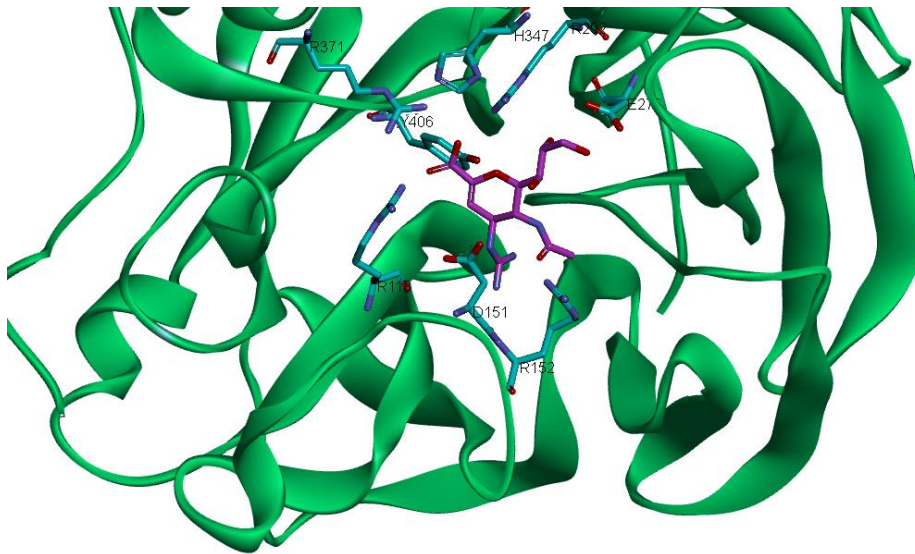


Figura 6. Estructura del sitio activo de la NA de la cepa de influenza aviar A/Chicken/Mexico/31381-7/1994 H5N2 unido a zanamivir. Los aminoácidos del sitio activo a los que se une Zanamivir son: R118, D151, R152, E276, R292, P327, R371, Y406. La secuencia se tomó de GenBank (acceso: AY497121). Las secuencias se alinearon con el programa Clustal Omega a partir de una N2 (PDB: 4GZQ) y las mutaciones se introdujeron en el programa Swiss PDB Viewer. La visualización con zanamivir se realizó con el programa Discovery Studio.

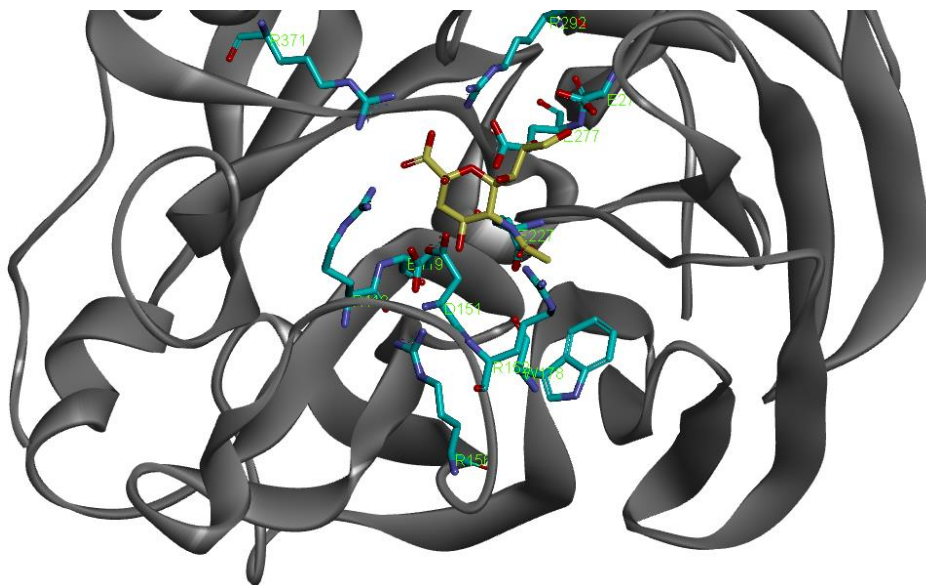


Figura 7. Estructura del sitio activo de la NA de la cepa de influenza humana A/Human/PuertoRico/8/1934 unido a ácido siálico. Los aminoácidos de sitio activo a los que se une el ácido siálico son: R118, E119, D151, R152, R156, W178, E227, E276, E277, R292, R371. La secuencia se tomó de GenBank (acceso: NC_002018.1). Las secuencias se alinearon con el programa Clustal Omega a partir de una N1 (PDB: 3B7E) y las mutaciones se introdujeron en el programa Swiss PDB Viewer. La visualización con zanamivir se realizó en el programa Discovery Studio.

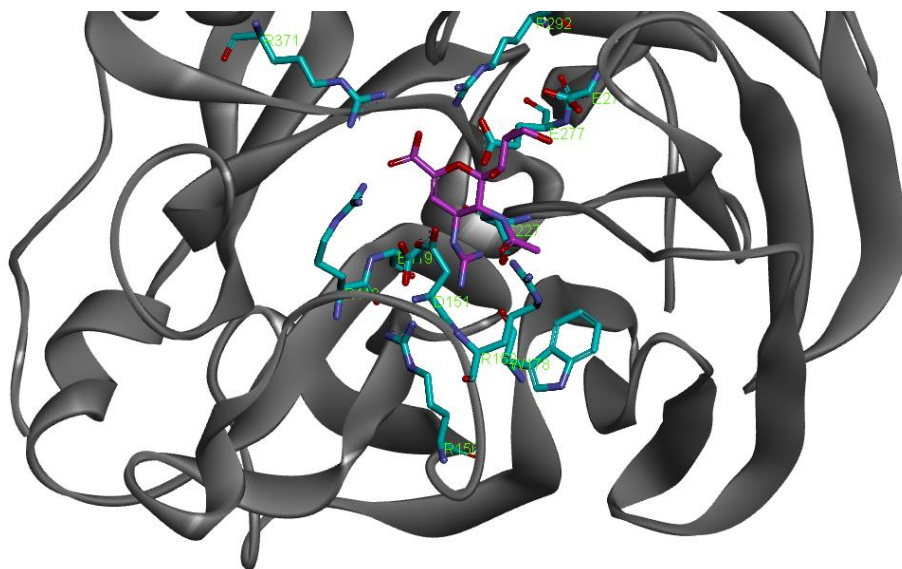


Figura 8. Estructura del sitio activo de la NA de la cepa de influenza humana A/Human/PuertoRico/8/1934 unido a zanamivir. Los aminoácidos de sitio activo a los que se une zanamivir son: R118, E119, D151, R152, R156, W178, E227, E276, E277, R292, R371. La secuencia se tomó de GenBank (acceso: NC_002018.1). Las secuencias se alinearon con el programa Clustal Omega a partir de una N1 (PDB: 3B7E) y mutaciones se introdujeron en el programa Swiss PDB Viewer. La visualización con zanamivir se realizó en el programa Discovery Studio.

Otros inhibidores

El peramivir [ácido-3-(1-acetamido-2-etil-butil)-4-(diaminometilideneamino)-2-hidroxiciclopentane-1-carboxílico]. Fue diseñado inicialmente como un fármaco oral pero debido a la falta de éxito en ensayos clínicos y a su pobre biodisponibilidad esta droga se probó parenteralmente. La administración parenteral permite ser suministrado a pacientes que no pueden utilizar la vía oral principalmente pacientes hospitalizados o que no toleran los inhibidores orales, también es usado en pacientes pediátricos.

Es derivado de un grupo carboxilado cargado negativamente, tiene un grupo guanidino cargado positivamente y difiere estructuralmente de los otros inhibidores de NA por una cadena lipofílica que da lugar a múltiples interacciones de unión con el sitio activo y permite al antiviral ser activo contra algunos virus que son resistentes a otros antivirales (Chand *et al.*, 2001). Sin embargo también ha mostrado resistencia ya que al tener un grupo hidrofóbico similar a oseltamivir puede ser afectado por las mismas mutaciones que éste (Babu *et al.*, 2000). Algunas de las mutaciones que se han descrito que causan resistencia a este fármaco son; R152K para influenza B, y para influenza A R292K, y E119D (Mishin *et al.*, 2005).

Peramivir ha demostrado tener buena actividad inhibitoria contra los virus de la influenza A y B en cultivos celulares y además en ensayos con animales muestra una reducción de la mortalidad. En ensayos clínicos muestra un alivio rápido de la fiebre en los pacientes en comparación con oseltamivir. En 2009 fue aprobado para su uso durante la pandemia de influenza A H1N1 y en 2014 fue aprobado oficialmente por la agencia federal para la administración de drogas y alimentos (FDA) de los EUA (McLaughlin *et al.*, 2015).

RESISTENCIA A INHIBIDORES DE NEURAMINIDASA

Se han reportado múltiples casos de resistencia a zanamivir y oseltamivir. En 2010 Okomo y colaboradores estudiaron un grupo de cepas de virus H1N1 de los cuales un 93% mostraron la mutación H275Y en la NA, la cual causa resistencia a oseltamivir (Okomo, et al., 2010) Durante la pandemia de 2009 todos los virus mostraron la sustitución de H275Y en el gen de

la NA provocando resistencia (Zepeda et al., 2010; Téllez-Sosa et al., 2013), otras mutaciones reportadas que confieren resistencia a oseltamivir fueron H274Y, D151V y D197E, N248D, S247N, I223R, N295, R156, W178, S179, I222, E227, E277, N294S, E425 (Chen *et al.*, 2009)

En cuanto a zanamivir, se han descrito las mutaciones R152, R292K y E119. R292K también causa resistencia a peramivir como se había dicho anteriormente, no obstante algunas mutaciones que afectan a zanamivir no impiden que peramivir siga siendo eficaz (Baum *et al.*, 2003).

Algunas mutaciones que confieren resistencia a zanamivir y oseltamivir son V116, I117, E119, Q136, K150, D151, D198, I223, D151V y N294 (Ramirez-Gonzalez *et al.*, 2011).

Las mutaciones H275Y y N294S confieren resistencia a peramivir y oseltamivir. Las mutaciones E119G y E119V producen multidrogo-resistencia, ya que confieren resistencia a zanamivir, oseltamivir y peramivir.

De manera interesante en estudios del sitio activo de la NA se ha descubierto que las mutaciones fuera del sitio activo han sido asociadas también con resistencia a Oseltamivir como son I149V y R257K (Tolentino-López *et al.*, 2013).

En cuanto a las sustituciones que han sido encontradas para el gen M2 y que provocan la resistencia a los adamantanos son L26, A27, A30, N31 y G34 (García-Sastre *et al.*, 1989).

ANÁLOGOS DEL ÁCIDO SIÁLICO

Los ácidos siálicos están involucrados en procesos de reconocimiento entre células y moléculas, son un componente necesario de receptores para muchas sustancias endógenas como hormonas y citocinas, se encuentran en la superficie de membranas de la mayoría de los animales y de las células humanas como parte de gangliósidos y tienen importancia en numerosos fenómenos biológicos. Los gangliósidos son componentes importantes de las membranas, son moléculas anfifílicas que consisten de una porción oligosacárida hidrofílica y

una porción ceramida hidrofóbica. La síntesis de ácidos siálicos modificados a partir de gangliósidos, como son los análogos del ácido siálico, han podido prepararse a través de síntesis quimioenzimática. La preparación de oligosacáridos es complicada, ya que implica numerosas etapas de reacción. El rendimiento suele ser bajo y la cantidad obtenida es reducida; sin embargo, el descubrimiento de fármacos a base de hidratos de carbono está estrechamente asociada con la disponibilidad de estructuras oligosacáridas complejas que pueden ser modificadas.

En el laboratorio de Química y Biotecnología de Oligosacáridos del Centro de Investigación en Macromoléculas Vegetales (CERMAV-CNRS Francia) se realizó la producción de dos moléculas sialiladas que pueden ser usadas como sustratos de la enzima NA (sialil- α 2,3-lactosa [3SL] y sialil- α 2,6-lactosa [6SL]). Además se diseñaron y sintetizaron dos moléculas con probable actividad antiviral (5 fenil-sialil- α 2,3-lactosa-alil [3FSL] y 5 fenil-sialil- α 2,6-lactosa-alil [6FSL]) mediante el uso de la tecnología del ADN recombinante; en *E. coli* se obtuvieron oligosacáridos con ácido siálico terminal, y posteriormente se modificaron las estructuras mediante síntesis orgánica. Las moléculas obtenidas pueden observarse en la figura 10.

Para el caso de las moléculas 3FSL y 6FSL la síntesis de ácido siálico se realizó a partir del gangliósido GM3 (GM3 es un monosialilgangliósido con residuos de azúcar neutros) preparado por bacterias recombinantes a través del proceso de fermentación, se realizaron modificaciones químicas que incluyen dos reacciones secuenciales, una reacción de-N-acetilación seguida por una acilación de la amina formada; dichas moléculas se utilizaron de manera exitosa para inhibir neuraminidasas. Se probó la inhibición de la hidrólisis del sustrato GM3allyl (enlace de tipo α 2,3) por la NA de *V. cholerae* al añadir la molécula 3FSL encontrando buenos resultados de inhibición como puede observarse en la figura 8. Se midió la liberación de alil- β -lactósido utilizando un kit de ensayo de lactosa (Birikaki *et al.*, 2015).

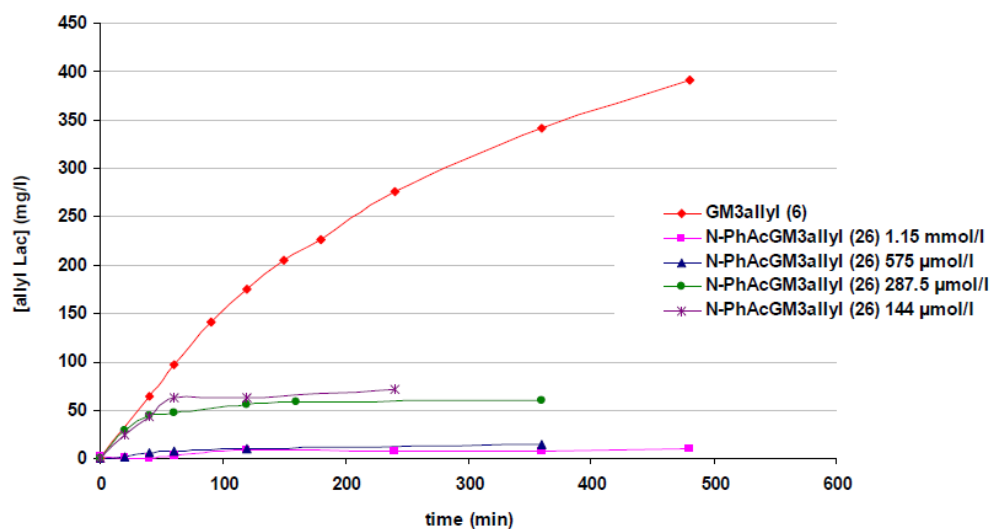


Figura 9. Hidrólisis enzimática de GM3allyl y reacción de inhibición con N-PhAcGM3allyl. Tomado de Birikaki *et al.*, 2015.

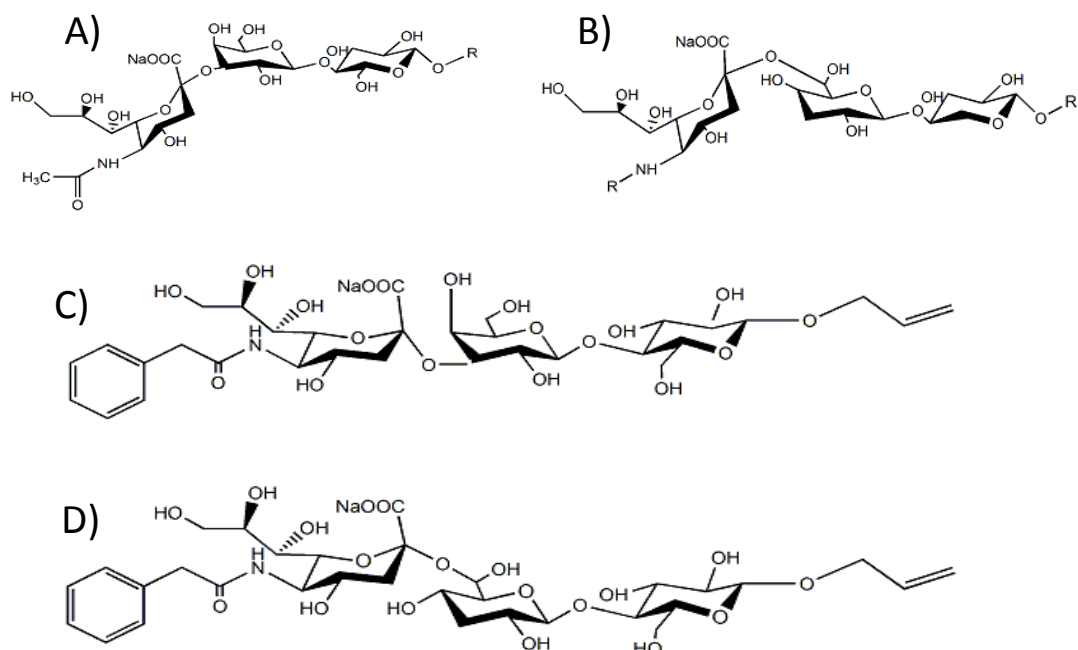


Figura 10. A) Estructura de la molécula sialil- α 2,3-lactosa (3SL). B) Estructura de la molécula sialil- α 2,6-lactosa (6SL). C) Estructura de la molécula 5 fenil-sialil- α 2,3-lactosa-aliil (3FSL). D) Estructura de la molécula 5 fenil-sialil- α 2,6-lactosa-aliil (6FSL). Las imágenes fueron realizadas con el programa Chemdraw.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Para mejorar la defensa contra las infecciones virales, es necesario un enfoque adicional basado en compuestos antivirales. Las moléculas generadas en el laboratorio CERMAV-CNRS (Francia) son capaces de inhibir la NA de *V. cholerae* encontrando una inhibición de casi el 100% al añadir la molécula fenil-sialil- α 2,3-lactosa-alil. Por lo tanto nos preguntamos si las moléculas que se sintetizaron pueden funcionar como inhibidores de la NA del virus de la influenza A.

JUSTIFICACIÓN

La influenza es un tema de gran interés sanitario y económico, que provoca una significativa morbilidad y mortalidad. Las enfermedades respiratorias según la OMS son la tercera causa de muerte en el mundo. La influenza afecta de modo especial a ancianos, niños y pacientes inmunocomprometidos propiciando el desarrollo de enfermedades oportunistas.

Es importante probar alternativas antivirales para el virus de la influenza A ya que, a pesar del esfuerzo de investigación desarrollado en los últimos años, los resultados han sido parcialmente satisfactorios a causa de la resistencia que los virus pueden llegar a desarrollar, muchos de los antivirales que se han estado utilizando actualmente han sido descontinuados.

HIPÓTESIS

La neuraminidasa del virus H1N1 reconoce la molécula fenil-sialil- α 2,6-lactosa-alil inhibiendo su actividad y su replicación en cultivo celular.

La neuraminidasa del virus H5N2 reconoce la molécula fenil-sialil- α 2,3-lactosa-alil inhibiendo su actividad y su replicación en cultivo celular.

OBJETIVOS

1. Determinar las condiciones ideales de reacción de las neuraminidasas de los virus de la influenza A H1N1 y H5N2 con ácido siálico.
2. Determinar la especificidad de las neuraminidasas de los virus de la influenza A H1N1 y H5N2 al ácido siálico.
3. Determinar la inhibición de las neuraminidasas de los virus de la influenza A H1N1 y H5N2 mediante análogos de ácido siálico.
4. Determinar la inhibición de la infección de los virus de la influenza A H1N1 y H5N2 en cultivo celular por las moléculas 3SFL y 6SFL.

DIAGRAMA DE TRABAJO

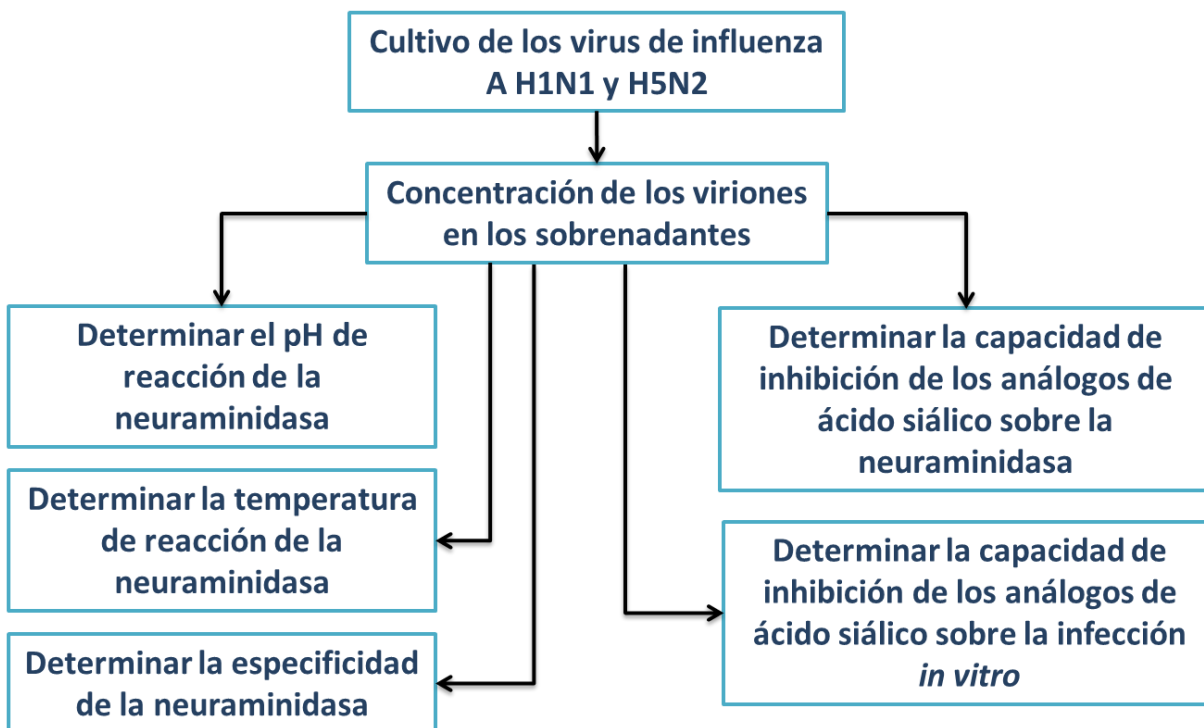


Figura 11. Diagrama de trabajo. Título arriba y sin número

MATERIAL Y MÉTODOS

CÉLULAS

Se utilizaron células de riñón canino Madin-Darby (MDCK), la cual es una línea celular utilizada en una gran cantidad de publicaciones para la infección de la influenza A.

Las células se cultivaron en medio mínimo esencial modificado de Dulbecco (DMEM) suplementadas con 5% de suero fetal bovino (SFB) y antibióticos (100 IU/ml de penicilina y 100 ug/ml de estreptomycin). Las células se mantuvieron en incubación a una temperatura de 37 °C y una atmósfera de 5% de CO₂.

VIRUS

Se utilizaron las cepas de influenza A humana A/Human/PuertoRico/8/1934 H1N1 y la cepa de influenza aviar A/Chicken/México/31381-7/1994 H5N2, las cuales se replicaron en células MDCK. Los virus se manejaron cumpliendo con los reglamentos de bioseguridad al menos de nivel 2 requeridos para el manejo de este virus (Organización Mundial de la Salud, 2005)

Inoculación de cultivos celulares y producción del sobrenadante viral

El virus de la influenza A aviar (H5N2) y humano (H1N1) se replicaron en la línea celular MDCK. A partir de una caja de 25 cm² de superficie se verificó que las células estuvieran saludables y en monocapa de un 80% a 90% de confluencia, el medio se eliminó y las células se lavaron dos veces con 5 ml de PBS. Se adicionaron 5 ml de PBS para mantener humectada la monocapa, mientras tanto se preparó el PBS de infección (dilución del inóculo viral 1:100; tripsina TPCK 1ug/ml, 1ml de PBS, antibiótico), se agregó el PBS de infección y se incubó a 37°C, CO₂ al 5%, durante 1 hora, se agitó suavemente cada 15 minutos, luego se retiró el PBS de infección, se lavó con 5 ml de PBS y se adicionaron 5 ml de medio de infección (DMEM 1X al 3% SFB, 1µg/ml TPCK). Se retiró el sobrenadante a las 48 horas cuando se observó el efecto citopático. Del sobrenadante obtenido se tomó una alícuota para infectar una nueva

caja y una alícuota para el ensayo de actividad de NA. Los sobrenadantes se congelaron a -80°C.

Concentración viral:

Se recolectó el sobrenadante viral, el cual se clarificó y posteriormente se concentró mediante ultra centrifugación. El sobrenadante viral se homogenizó y repartió en volúmenes iguales (30 ml) en tubos para centrífuga los cuales se centrifugaron por 1 hora a 80,000xg a 4°C. El sedimento obtenido se diluyó en 5 ml de agua estéril, posteriormente se prepararon alícuotas, que se almacenaron a -80°C.

MEDICIÓN DE ACTIVIDAD DE NEURAMINIDASA

Ensayo de actividad de neuraminidasa

Este ensayo consiste en la incubación de una mezcla que contiene enzima (virus), sustrato (fetuína u otra molécula sialilada) y amortiguador de acetatos. La mezcla se incubó durante 30 minutos a 37 °C. El ácido siálico liberado por la enzima se cuantificó mediante el método del ácido tiobarbitúrico modificado por Santos-López, que consiste en la oxidación del ácido siálico por el ácido periódico y su posterior combinación con el ácido tiobarbitúrico para dar un complejo colorido cuya absorbancia máxima se registra a 550 nm (Aminoff, 1961; Aymard-Henry *et al.*, 1973; Horgan, 1981; Santos-Lopez *et al.*, 2004).

Se agregaron 50 µl de enzima (dilución 1:1 para H1N1 y 1:4 para H5N1), 50 µl de sustrato fetuína, 50 µl de amortiguador y 50 µl de agua, esta mezcla de reacción se incubó a 37°C por 30 minutos, posteriormente se detuvo la reacción al inactivar la enzima colocando la mezcla de reacción en agua hirviendo por 2 minutos, se agregó 50 µl de ácido periódico recién hecho y se incubó 30 minutos a 37°C. Una vez pasado este tiempo se agregaron 40 µl de meta-arsenito de sodio para inactivar el exceso de ácido periódico, al hacer reacción se observó un color marrón, cuando el color marrón desapareció se agregaron 200 µl de ácido tiobarbitúrico que hace reacción con el ácido siálico oxidado (ácido β formol pirúvico) y se colocó en agua hirviendo por 10 minutos, se observándose un color rosado que va en aumento durante la ebullición, después se pasó a un baño de hielo por 2 minutos, (proceso durante el cual

disminuye la coloración) y luego se colocó en incubación a 37°C por 2 minutos, después de lo cual la coloración se recupera. Se añadieron 500 µl de butanol/HCl para extraer el color y se agitó vigorosamente en el vórtex, posteriormente se centrifugó a 1000xg/ por 5 minutos. Se tomaron 250 µl de la fase superior y se colocaron en una placa de 96 pozos. Se realizó una lectura de absorbancia a 550 nm y 620 nm como control. Todos los experimentos se realizaron por triplicado. Las concentraciones de cada reactivo se encuentran en la tabla 4.

Actividad de neuraminidasa viral a diferente pH

Para la evaluación de la actividad de NA viral a diversos valores de pH, la incubación de la mezcla se hizo con un amortiguador de acetatos y se midió la actividad NA siguiendo el procedimiento del ácido tiobarbitúrico antes descrito. El amortiguador de acetatos funciona de manera adecuada en un rango de pH de 3.5 a 5.6 (Dawson, 1986). Se incluyeron soluciones con pH de 3.5, 4, 4.5, 5 y 5.5.

Actividad de neuraminidasa viral a diferentes temperaturas

Para la evaluación de la actividad de NA viral a diversas temperaturas se realizó la incubación de la mezcla de enzima, sustrato y amortiguador a las siguientes temperaturas: 25, 30, 37, 40, 45 y 50 °C. La determinación de la actividad NA se realizó la manera antes descrita.

Actividad de neuraminidasa viral con diferentes sustratos

Para evaluar la especificidad de la NA viral, se sustituyó la fetuína sérica bovina (10 mg/ml) por 3SL y 6SL a diferentes concentraciones (1-4 mg/ml) se realizó el procedimiento descrito de determinación de actividad NA para determinar la actividad NA sobre los dos sustratos.

Ensayo de inhibición de la actividad de neuraminidasa

Este ensayo se realizó de la misma manera que el ensayo de actividad NA pero se agregó además un inhibidor o un probable inhibidor a la reacción, en este caso se utilizó zanamivir como control, y se probaron las moléculas 5FSL 2,3 y 5FSL 2,6. Se realizó una incubación

previa a 25°C por 30 minutos con 50 µl de enzima (virus), 50 µl de amortiguador y 50µl de inhibidor. Posteriormente se agregaron 50 µl de sustrato (fetuína). La mezcla de reacción se incubó a 37°C por 30 minutos y el ensayo procedió normalmente.

En la siguiente tabla se resumen los ensayos que se realizaron.

Tabla 1. Ensayos de actividad NA.

Mezcla de reacciones para los ensayos de actividad de NA						
Reactivos	Ensayos con diferentes Sustratos (µl)	Ensayos de Inhibición (µl)	Control negativo (µl)	Control positivo (µl)	Control de inhibición(µl)	Ensayos con diferentes pH y temperaturas
Agua	50	0	100	50	0	50
Amortiguador ¹	50	50	50	50	50	50
Enzima	50	50	0	50	0	50
Fetuína	50/0 ²	50	50	50	50	50
3SL	50/0 ²	0	0	0	0	0
6SL	50/0 ²	0	0	0	0	0
Zanamivir	0	50/0 ³	0	0	50/0 ³	0
3FSL	0	50/0 ³	0	0	50/0 ³	0
6FSL	0	0/50 ³	0	0	50/0 ³	0
TOTAL	200	200	200	200	200	200

¹ Amortiguador de acetatos pH 4.5. ² Se coloca un único sustrato; fetuína / 3SL / o 6SL. ³ Se coloca un único inhibidor; zanamivir / 3FSL / o 6FSL.

Curva de ácido siálico

Para calcular la cantidad de ácido siálico liberado se realizó una curva estándar de ácido siálico (ácido 5-N-acetil neuramínico) puro (Sigma). Se mezclaron 50 µl (1, 2, 4, 6, 8 y 10 nmol) de ácido siálico, 50 µl de amortiguador de acetatos y 100 µl de agua y se procedió directamente a la incubación con ácido periódico de acuerdo con el procedimiento descrito.

Cuantificación de proteína (Método de Bradford)

El método de Bradford para cuantificar proteínas depende cuantitativamente de la unión del colorante azul brillante de Coomassie, a las proteínas. Como estándar se utilizó albúmina sérica bovina. El rango de trabajo de este método es de 10 a 100 µg. Se prepararon alícuotas por duplicado con la cantidad de 0.5 mg/ml BSA (5, 10, 15, 20 µl) y con 0.15 M NaCl se llevó el volumen final a 100 µl. Alícuotas de 100 µl de NaCl 0.15 M se utilizaron como blancos, se añadió 1 ml del reactivo de Bradford y se mezcló en vórtex, se dejó reposar durante 2 minutos a temperatura ambiente. Se determinó la lectura a una absorbancia de 595 nm.

CUANTIFICACIÓN DE PLACAS LÍTICAS

Cuantificación de virus en los sobrenadantes de las células infectadas mediante el método de placas líticas.

Se utilizaron dos botellas de cultivo de 25 cm² con confluencia de casi el 100% (4×10^6 células) se lavaron dos veces con PBS, posteriormente se adicionaron 500 µl de tripsina/EDTA para levantar las células, se esperó un minuto y se retiró la tripsina. Posteriormente se incubó a 37°C durante 2 minutos aproximadamente, al levantarse la monocapa se resuspendió en 4 ml de DMEM con 5% de SFB y se procedió a trasvasarla en un tubo de 15 ml (ambas cajas), obteniendo 8 ml de medio con 8×10^6 células, se homogenizó y se adicionaron 0.5 ml a una placa de 12 pozos. A cada pozo se le agregaron 5×10^5 células para alcanzar una confluencia del 70%, se adicionaron 0.5 ml de DMEM con 5% de SFB, y se

incubó a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5% durante 24 horas, al término de la incubación se procedió a infectar con diferentes diluciones de los virus H1N1 y H5N2.

Infección de las células MDCK

Las células se infectaron con virus suspendido en /DMEM sin SFB/ y en presencia de tripsina TPCK durante una hora a 37°C con agitación suave de la placa cada 10 minutos (la tripsina TPCK se utilizó a una concentración de 1 µg/µl, se adicionó 1µl por cada ml de medio para infectar, en este caso adicionamos 0.2 µl por cada pozo). Después de este procedimiento, se retiró todo el sobrenadante y se adicionó una mezcla volumen/volumen de agarosa al 0.35% con DMEM 2X y 5% de SFB (frio) y tripsina TPCK. Se dejó solidificar la agarosa a temperatura ambiente. Se incubó durante 72 horas a 37°C y a una atmósfera de CO₂ al 5%. Al término de la incubación se procedió a fijar con 300 µl de ácido tricloroacético al 10% y se dejó incubar durante 10 minutos a temperatura ambiente. Después de esto se retiró la agarosa con cuidado de no dañar la monocapa y se adicionaron 300 µl de cristal violeta al 0.1% (en etanol al 20%). Se dejó a temperatura ambiente durante 15 minutos, una vez pasado ese tiempo se eliminó el cristal violeta y se lavó con agua corriente. Posteriormente se procedió a cuantificar el número de unidades formadoras de placas líticas (PFU) utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Título viral (PFU/ml)} = \frac{\text{Número de placas líticas} \times \text{factor de dilución}}{\text{Volumen de infección}}$$

Ensayo de inhibición de la formación de placas líticas

Este ensayo se realizó tomando en cuenta el método de formación de placas líticas mencionado. La diferencia fue que el virus se incubó previamente con los probables inhibidores a diferentes concentraciones y con el zanamivir, que se utilizó como control de inhibición.

RESULTADOS

RELACIÓN ÁCIDO SIÁLICO Y ACTIVIDAD DE NEURAMINIDASA

Para obtener la actividad de NA a partir de la absorbancia se realizó una curva de calibración de ácido siálico como se muestra en la figura 12 y se calculó la cantidad de ácido siálico liberado en 30 minutos a partir de la ecuación $y = [(0.0807x + 0.0051)/30]$, donde x es el valor de absorbancia obtenido por nmol de ácido siálico liberado.

De las absorbancias obtenidas se tomó como punto máximo para los ensayos una absorbancia de 0.8 aproximadamente, correspondiente al rango lineal de la curva.

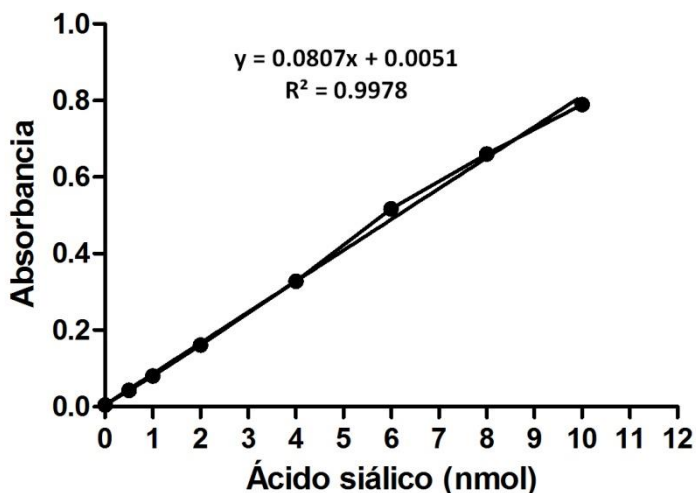


Figura 12. Curva de calibración de ácido siálico.

CONCENTRADOS VIRALES

En trabajos previos de nuestro laboratorio hemos observado que la determinación enzimática y los estudios de inhibición pueden presentar interferencias cuando se usan los sobrenadantes de los cultivos infectados directamente, por lo cual estos sobrenadantes se concentraron mediante ultracentrifugación, lo cual también eliminó grandes cantidades de proteínas del medio de cultivo, así como sales y otros compuestos presentes. Se realizaron infecciones del

virus de la influenza A H1N1 y H5N2 en cultivo celular MDCK, como se describió en la sección de métodos, se obtuvo el sobrenadante viral para ambos virus, a los cuales se les determinó su actividad de NA antes y después de ser concentrado obteniendo mayor actividad de NA en ambos casos en los concentrados como se observa en las tablas 3 y 4, donde se muestra la actividad obtenida del sobrenadante infectado antes del proceso de clarificación y ultracentrifugación y después de dicho proceso.

Tabla 2. Actividad enzimática obtenida de los sobrenadantes y concentrados para el virus H1N1.

	Actividad NA* (μ U.min-1)	Volumen total (ml)	Actividad NA total (μ U.min-1)	Rendimiento (%)
Sobrenadante	93.58	30.00	56150.35	100
Concentrado	356.01	5.00	35600.99	63

*La actividad de neuraminidasa se determinó en un volumen de 50 μ l.

Tabla 3. Actividad enzimática obtenida de los sobrenadantes y concentrados para el virus H5N2.

	Actividad NA* (μ U.min-1)	Volumen total (ml)	Actividad NA total (μ U.min-1)	Rendimiento (%)
Sobrenadante	216.67	30.00	130004.13	100
Concentrado	855.80	5.00	85580.33	66

*La actividad de neuraminidasa se determinó en un volumen de 50 μ l.

La actividad inicial que se obtuvo se calculó en un volumen de reacción de 50 μ l y para obtener la actividad total la actividad inicial se multiplicó por el volumen final, en este caso para el sobrenadante fueron 30 ml y para el concentrado 5 ml. Puede observarse que la actividad total disminuye del sobrenadante inicial en comparación con el concentrado de un 100% a un 60% en ambas cepas; sin embargo, también podemos observar que la actividad de NA en el concentrado final aumenta en comparación con el sobrenadante inicial. Por lo que a pesar de no poder recuperar la actividad total en nuestro concentrado, se obtuvo una muestra con mayor actividad de NA en un volumen menor y con menor cantidad de proteínas celulares y residuos del medio de cultivo.

Con los concentrados de ambos virus se realizaron los ensayos de actividad NA; para esto se hicieron diluciones del concentrado viral: 1, 1:2, 1:4, 1:6, 1:8 y 1:10, como se muestra en la figura 13 con el fin de obtener una dilución óptima para los ensayos con los sustratos y con los inhibidores de la enzima.

A partir de la relación ácido siálico anteriormente descrita, se calculó la actividad NA de los concentrados virales H1N1 y H5N2. Una unidad de actividad enzimática es igual a un μmol de sustrato (en este caso ácido siálico) liberado por minuto. Se obtuvo para la dilución 1:1 de 340 μmol por minuto y para la dilución 1/4 de H5N2 350 μmol por minuto.

Se calculó la cantidad de proteína presente en los concentrados virales a partir de la ecuación $Y=0.0072x+0.0715$, donde x es el valor de absorbancia obtenido por μg de albúmina sérica bovina. Se realizó una dilución 1:4 del concentrado viral H5N2 que corresponde a 91.68 μg de proteína y para H1N1 tomamos el concentrado sin diluir correspondiente a 90.16 μg de proteína.

De esta manera se calculó la actividad específica de la enzima dividiendo la cantidad de ácido siálico liberado por minuto por μg de proteína, obteniendo para H1N1 3.783633 $\text{mU}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ y para H5N2 3.84222 $\text{mU}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$.

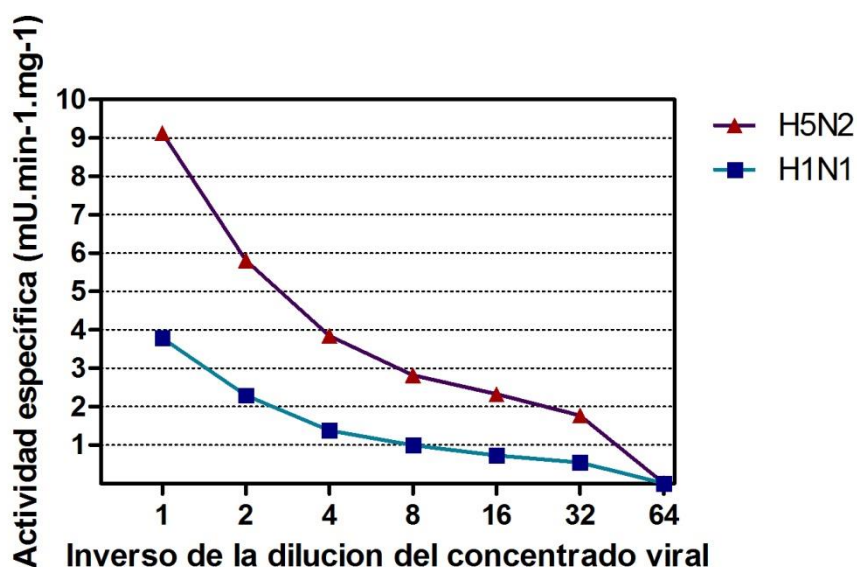


Figura 13. Actividad específica de NA de los concentrados virales H1N1 y H5N2.

En la figura 14 puede observarse el ensayo con las diferentes diluciones del concentrado viral para H5N2 y para H1N1. Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

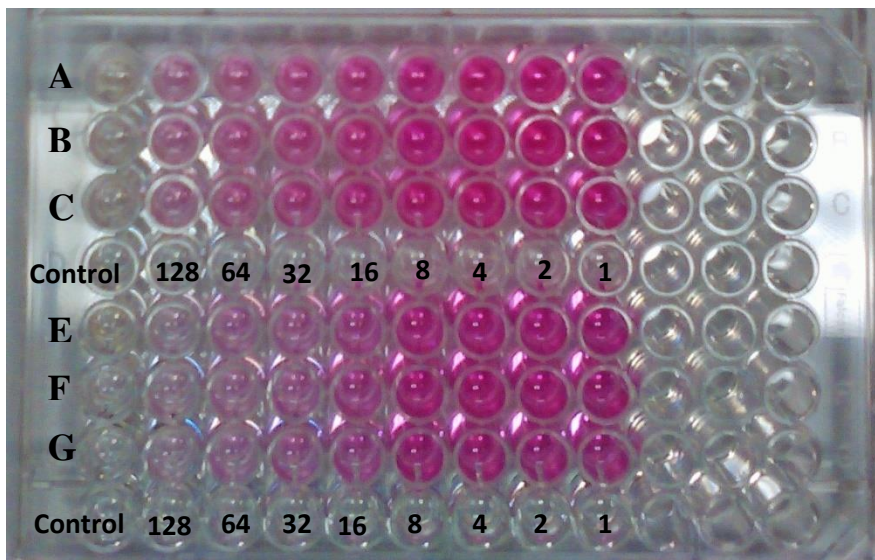


Figura 14. Ensayo de actividad de NA. Se muestran diluciones de los concentrados virales H5N2 (A-C) y H1N1 (E-G).

ACTIVIDAD DE NEURAMINIDASA SOBRE FETUÍNA COMO SUSTRATO

Se midió la actividad NA viral utilizando como sustrato fetuína: se utilizaron 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, y 16 mg/ml. El virus H1N1 se mantuvo constante después de los 10 mg/ml y el virus H5N2 mostró un ligero incremento después de esa concentración. Ambos virus tuvieron una alta actividad específica a los 10 mg/ml, por lo que esta cantidad de fetuína se tomó para el control de todos nuestros experimentos correspondiente al 100% de la actividad enzimática.

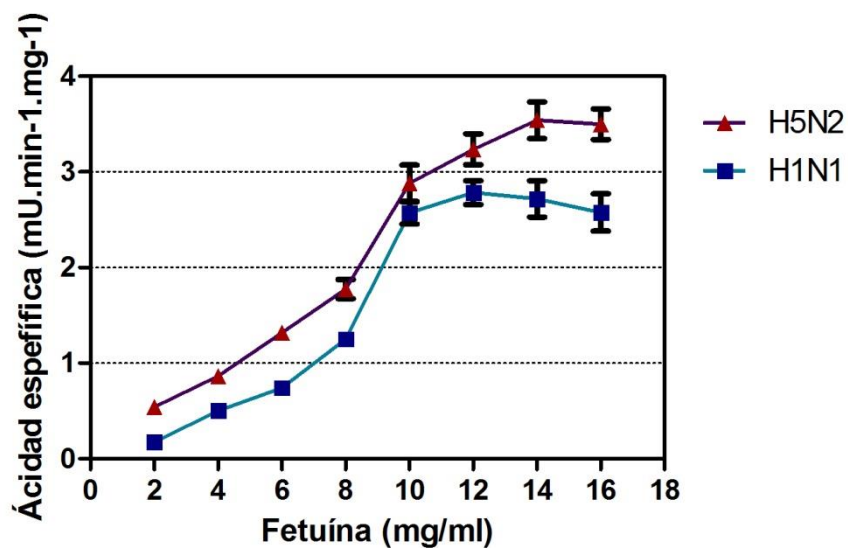


Figura 15. Actividad específica de NA de los virus H1N1 y H5N2 con fetuína como sustrato.

ACTIVIDAD DE NEURAMINIDASA A DIFERENTE pH

La actividad de NA del virus H1N1 y H5N2 se determinó utilizando un amortiguador de acetatos a diferente pH: 3.5, 3.7, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, el punto más alto se obtuvo a pH 4.5 para ambos virus. En la figura 16 se puede observar la curva de actividad de NA para las cepas H1N1 y H5N2, aunque presentan rangos relativamente amplios de pH en los que la actividad es importante.

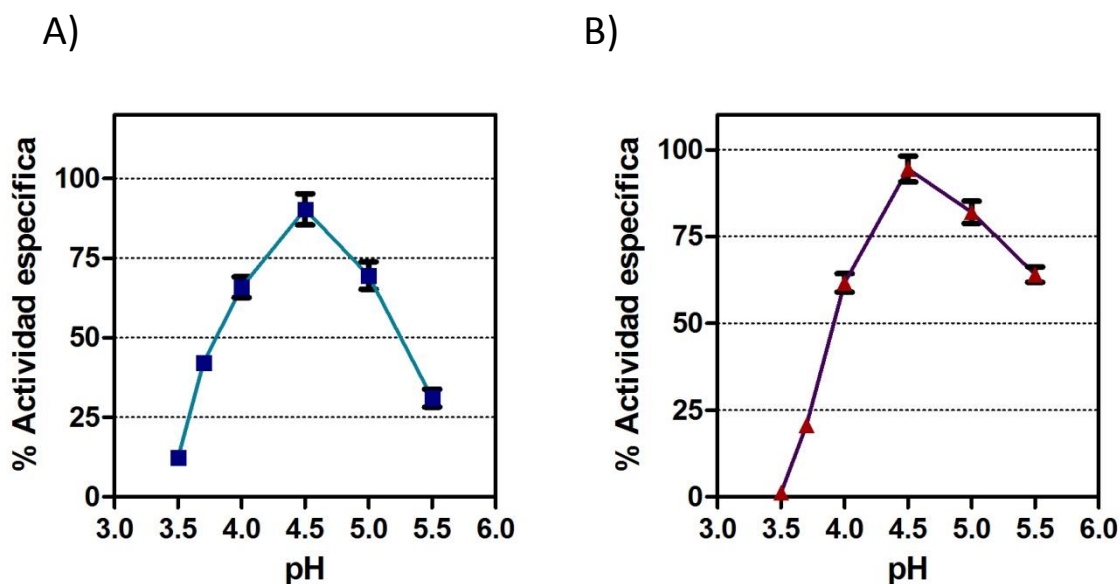


Figura 16. Actividad de NA específica del virus H1N1 (A) y del virus H5N2 (B), a diferente pH.

ACTIVIDAD DE NEURAMINIDASA A DIFERENTE TEMPERATURA

Se midió la actividad de NA del virus H1N1 y H5N2 a diferentes temperaturas; 20, 25, 30, 37, 40, 45, y 50°C durante el tiempo de incubación de la enzima. Como se muestra en la figura 17 (A y B) para H1N1 y H5N2 respectivamente, la mayor actividad específica para ambos virus se obtuvo a 37°C.

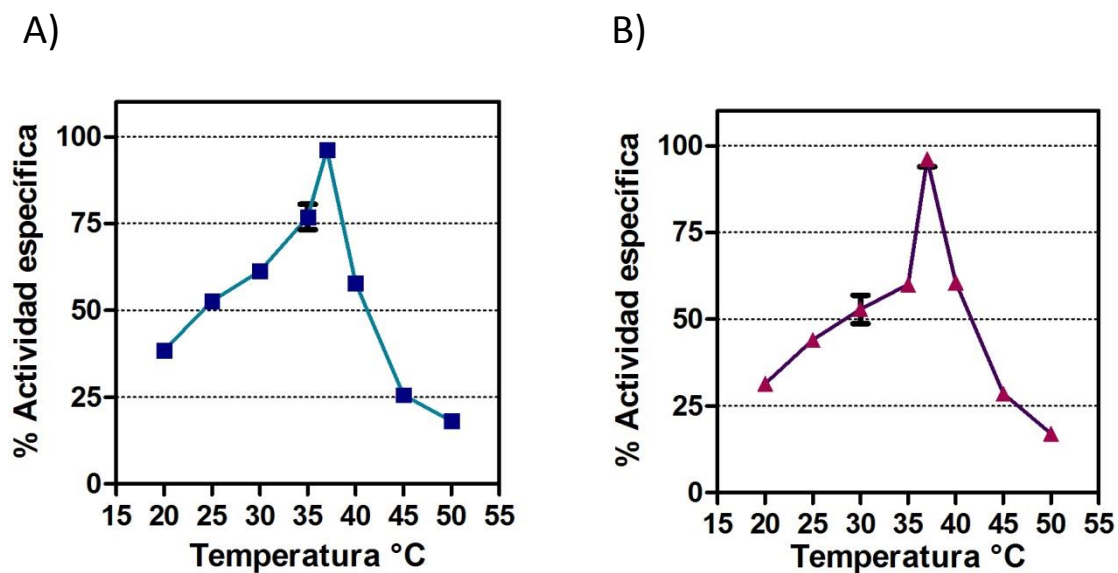


Figura 17. Actividad de NA del virus H1N1 (A) y del virus H5N2 (B), a diversas temperaturas.

ACTIVIDAD DE NEURAMINIDASA SOBRE EL SUSTRATO SIALIL α 2,3 LACTOSA

Se midió la liberación de ácido siálico con 3SL como sustrato: se utilizaron 1- 4 mg/ml. Se utilizó como control fetuína a 10 mg/ml tomándose como el 100% de actividad. El virus H1N1 no mostró actividad con este sustrato. Con el virus H5N2 se obtuvo una actividad elevada como se observa en la figura 18 A.

ACTIVIDAD DE NEURAMINIDASA SOBRE EL SUSTRATO SIALIL α 2,6 LACTOSA

Se midió la actividad NA utilizando como sustrato 6SL: se utilizó 1- 4 mg/ml de este sustrato. Se utilizó como control a fetuína a 10 mg/ml se usó como control. Con H1N1 se obtuvo una actividad elevada mientras que el virus H5N2 mostró menor actividad como puede observarse en la figura 18 B.

Se comparó la actividad NA usando dos cantidades de sustrato: 2.2 y 4.0 mg/ml, correspondientes a la parte lineal de crecimiento de la curva y a la parte de saturación respectivamente. (Ver línea punteada roja, Figura 18).

Para H1N1 (Figura 18 A) encontramos que en la parte lineal de crecimiento (2.2 mg/ml) para 6SL hay una diferencia de 25 veces más la cantidad (25.65) obtenida con el sustrato 3SL; y para la parte de saturación (4.0 mg/ml) una diferencia de 10 veces más la cantidad (10.6) obtenida con el sustrato 6SL que con 3SL.

Para H5N2 (Figura 18 B) encontramos que en la parte lineal de crecimiento (2.2 mg/ml) no encontramos diferencias entre el sustrato 6SL y el sustrato 3SL; sin embargo, en la parte de saturación para el sustrato 3SL encontramos una diferencia de 2 veces más la cantidad obtenida (2.48) para el sustrato 6SL.

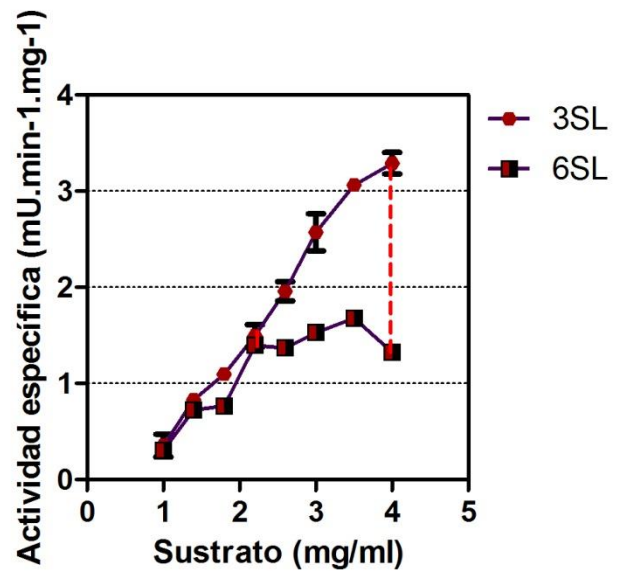
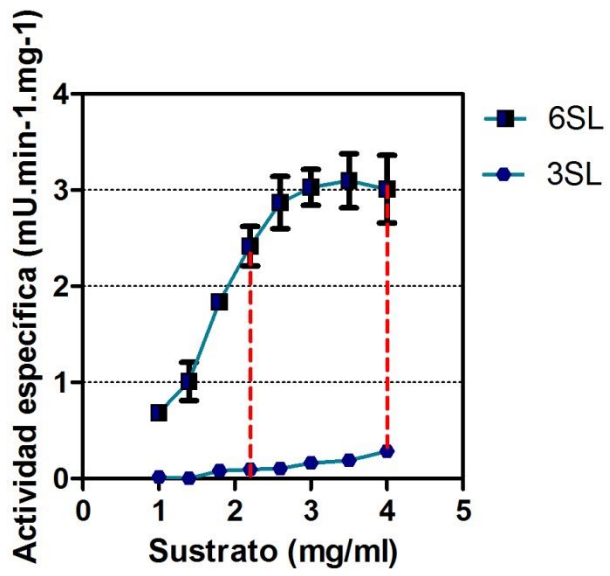


Figura 18. Actividad de NA específica del virus H1N1 (A) y del virus H5N2 (B) por el sustrato 3SL y 6SL.

INHIBICIÓN DE LA ACTIVIDAD DE NEURAMINIDASA POR EL INHIBIDOR ZANAMIVIR

Se midió la actividad NA y se usó zanamivir como inhibidor de la enzima. Se utilizó desde 100 hasta 14000 nM de dicho inhibidor. Para H1N1 se encontró una constante de inhibición al 50% (IC_{50}) de 367.2 nM (Figura 19) y para H5N2 la IC_{50} fue de 4792 nM (Figura 20).

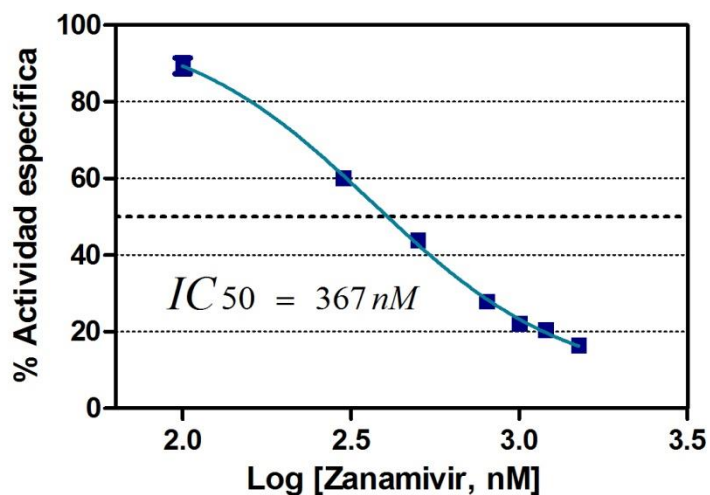


Figura 19. Inhibición de la actividad de NA específica de H1N1 por zanamivir. La línea punteada representa el 50% de la actividad de NA alcanzada, en este caso la IC_{50} fue de 367 nM.

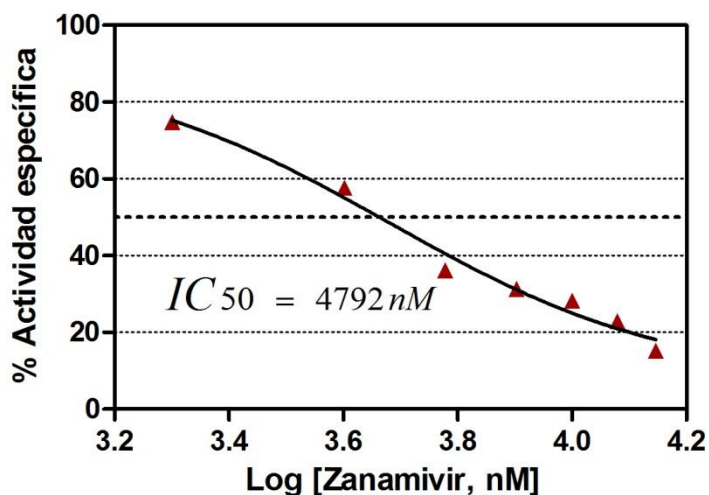


Figura 20. Inhibición de la actividad de NA de H5N2 por zanamivir. La línea punteada representa el 50% de la actividad de NA alcanzada, en este caso la IC_{50} fue de 4792 nM.

ENSAYO DE INHIBICIÓN DE LA ACTIVIDAD DE NEURAMINIDASA POR LA MOLÉCULA 5FENIL SIALIL α 2,3 LACTOSA ALIL

Se midió la actividad NA usando 3FSL como inhibidor de la enzima. Se tomaron de referencia los valores de IC_{50} obtenidos usando como inhibidor a zanamivir para cada una de las cepas; 367.2 nM para H1N1 y 4792 nM para H5N2. Para H1N1 se utilizó de 100-1500 nM de 3SFL y para H5N2 de 2000-14000 nM de 3SFL.

En la figura 21 podemos ver la inhibición de zanamivir y el comportamiento de la enzima de la cepa H1N1 con la molécula 3FSL sin observar disminución de la actividad.

En la figura 22 podemos ver la inhibición de zanamivir y el comportamiento de la enzima de la cepa H5N2 con la molécula 3FSL que tampoco muestra disminución de la actividad.

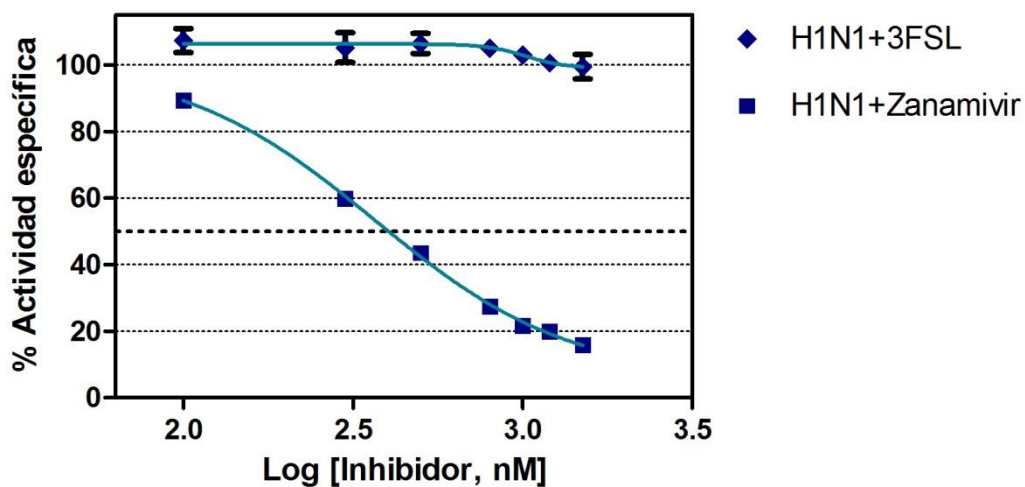


Figura 21. Ensayo de inhibición de la actividad de NA de H1N1 por 3FSL. La línea punteada representa el 50% de la actividad de NA alcanzada. Se calculó la IC_{50} con zanamivir = 367.2 nM.

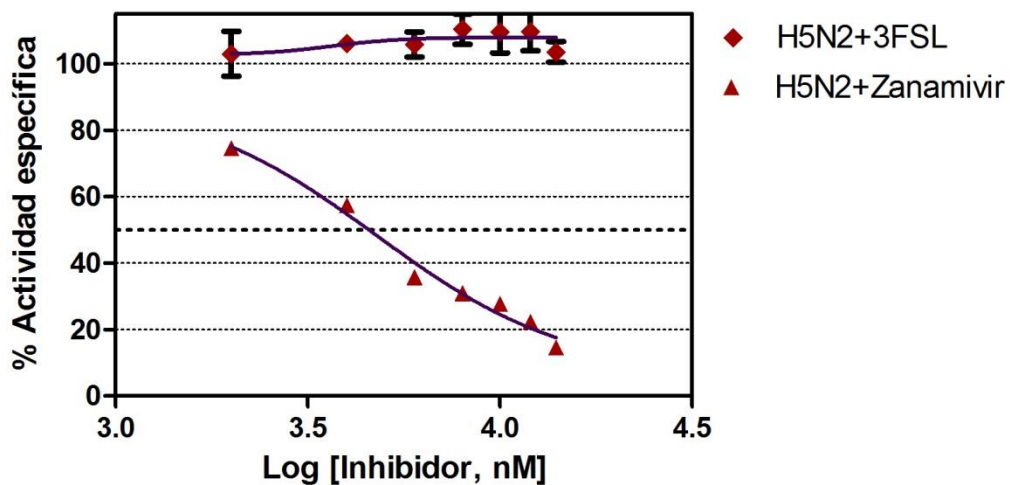


Figura 22. Ensayos de inhibición de la actividad de NA de H5N2 por 3FSL. La línea punteada representa el 50% de la actividad de NA alcanzada. Se calculó la IC_{50} con zanamivir = 4792 nM.

Posteriormente debido a los resultados anteriores, se aumentaron las concentraciones del inhibidor y se realizaron nuevamente los ensayos de inhibición con ambas cepas.

En la figura 23 y 24 para H1N1 y para H5N2 respectivamente podemos ver el comportamiento a mayor concentración de dicho inhibidor, para H1N1 se aumentó hasta 14 μM y para H5N2 la concentración se aumentó hasta 140 μM como se observa tampoco hay disminución de la actividad.

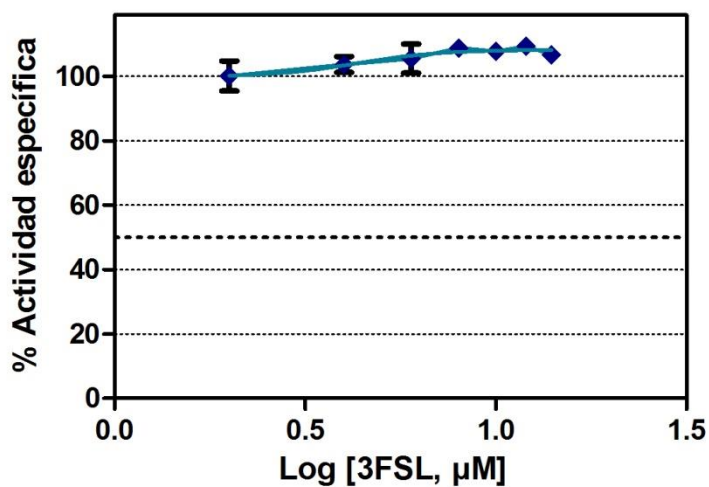


Figura 23. Ensayo de inhibición de la actividad de NA de H1N1 por 3FSL. La línea punteada representa el 50% de la actividad de NA alcanzada.

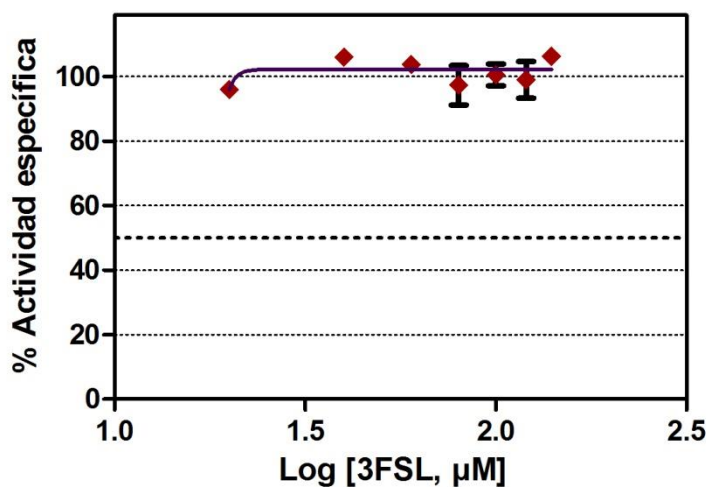


Figura 24. Ensayos de inhibición de la actividad de NA de H5N2 por 3FSL. La línea punteada representa el 50% de la actividad de NA alcanzada.

ENSAYO DE INHIBICIÓN DE ACTIVIDAD DE NEURAMINIDASA CON LA MOLÉCULA 5FENIL SIALIL α 2,6 LACTOSA ALIL

Se midió la actividad NA usando 6FSL como inhibidor de la enzima. Se utilizaron las mismas concentraciones que para zanamivir; 100-14000nM.

En la figura 25 podemos observar el comportamiento de la enzima de la cepa H1N1 con la molécula 6FSL y la inhibición por zanamivir. En la figura 26 podemos ver la inhibición de zanamivir y el comportamiento de la enzima de la cepa H5N2.

En ambos casos observamos inhibición, con una IC_{50} de 916.6 nM para H1N1 y 11885 nM para H5N2 sin embargo los valores de IC_{50} son mucho más altos que los encontrados cuando se usa zanamivir.

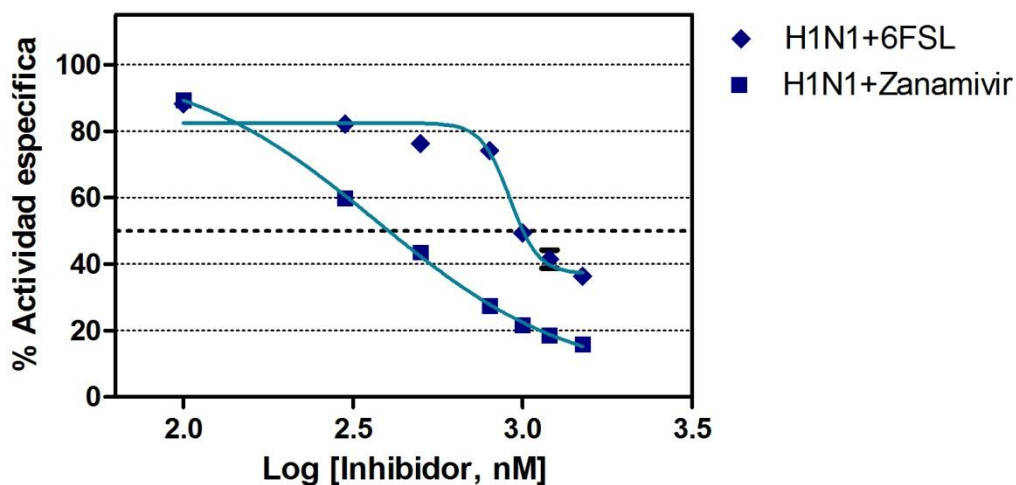


Figura 25. Inhibición de la actividad de NA de H1N1 por 6FSL. La línea punteada representa el 50% de la actividad de NA alcanzada. IC_{50} con 6FSL = 916.6 nM. IC_{50} con zanamivir = 367.2 nM.

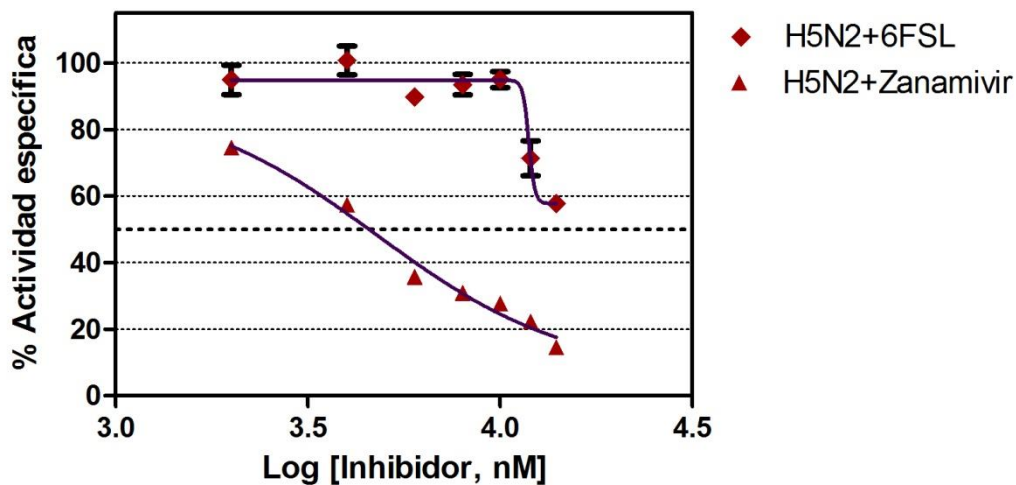


Figura 26. Inhibición de la actividad de NA de H5N2 por 6FSL. La línea punteada representa el 50% de la actividad de NA alcanzada. IC_{50} con 6FSL=11885 nM. IC_{50} con zanamivir = 4792 nM.

Debido a que se observó una disminución de la actividad de NA usando la molécula 6FSL, se decidió aumentar las concentraciones de estas moléculas y probarlas para cada cepa. Para H1N1 se aumentó a 14 μM y para H5N2 la concentración se aumentó a 140 μM .

En la Figura 27 podemos ver el comportamiento de la cepa H1N1 a mayor concentración de 6FSL, como se observa, no hay disminución de la actividad, incluso se aprecia un incremento en la actividad, el cual ya no corresponde al rango lineal de la curva.

De la misma manera a mayores concentraciones del inhibidor con la cepa H5N2 como se observa en la Figura 28, no hay disminución de la actividad y al igual que con H1N1 la actividad se incrementa.

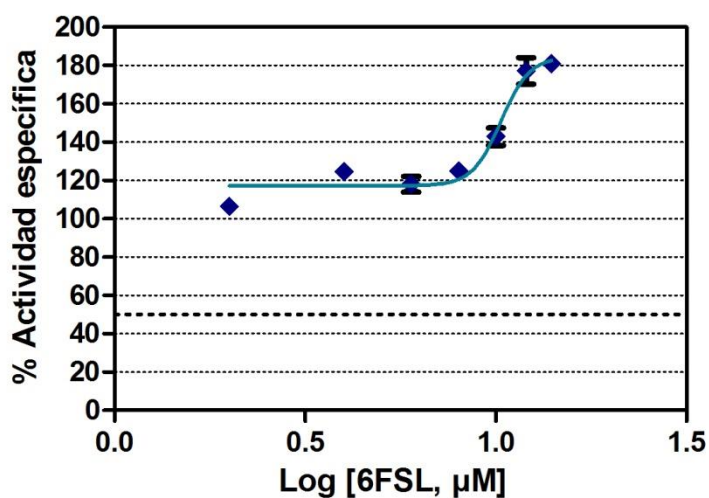


Figura 27. Ensayo de inhibición de la actividad de NA de H1N1 por 6FSL. La línea punteada representa el 50% de la actividad de NA alcanzada.

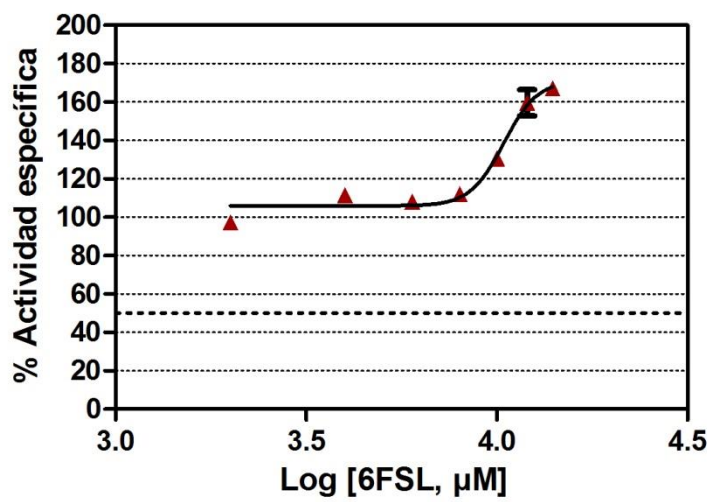


Figura 28. Ensayo de inhibición de la actividad de NA de H5N2 por 6FSL. La línea punteada representa el 50% de la actividad de NA alcanzada.

ENSAYOS DE INHIBICIÓN DE PLACAS LÍTICAS

Se realizó la titulación con ambas cepas virales, se realizaron diluciones 1×10^{-1} , 1×10^{-2} , 1×10^{-3} , 1×10^{-4} , y 1×10^{-5} . En la figura 29 se puede observar la formación de placas líticas por el virus H1N1. Se pudieron contabilizar el número de placas a partir de la dilución 1×10^{-5} obteniendo un total de 72 UFP en un volumen de 400 μl para dicha dilución. Se calculó un título viral para la muestra original de 1.8×10^7 UFP/ml.

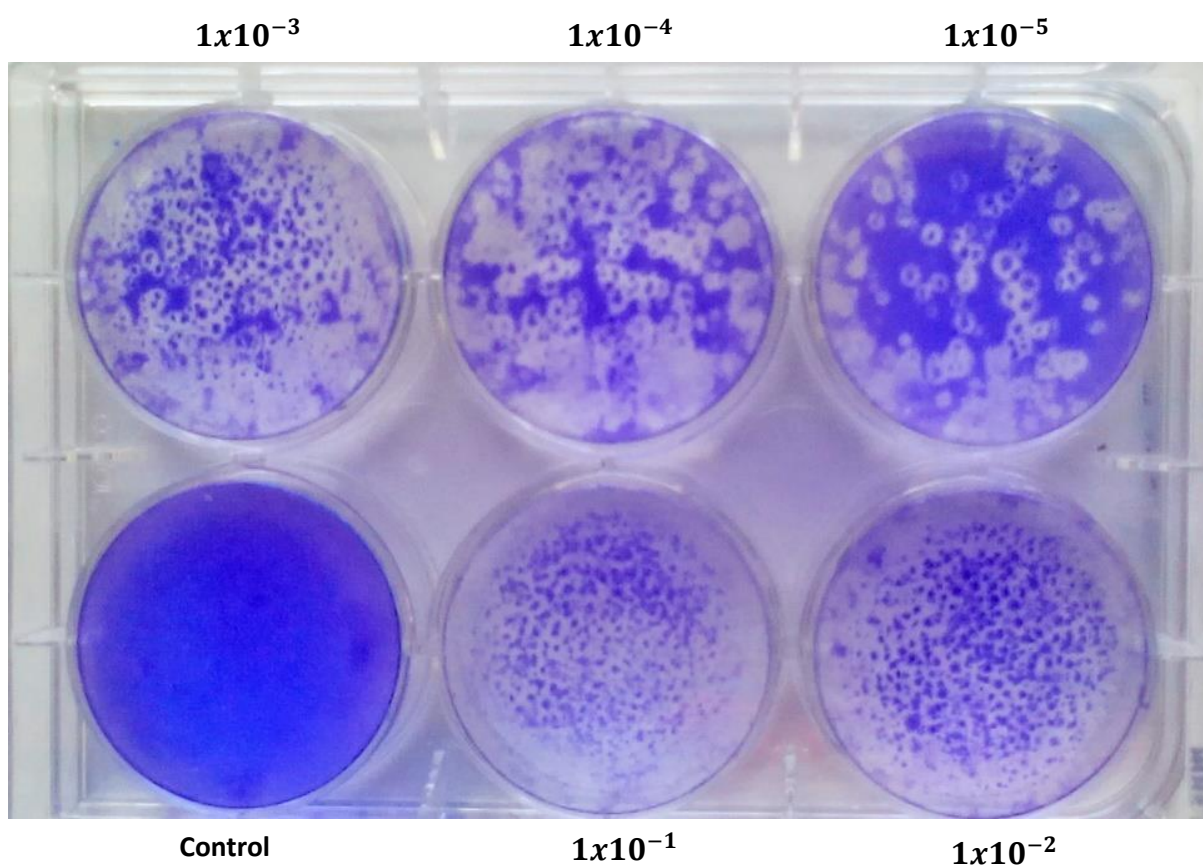


Figura 29. Titulación de placas líticas con el virus H1N1

En la figura 30 podemos observar la formación de placas líticas por el virus H5N2, se pudieron contabilizar el número de placas a partir de la dilución 1×10^{-5} obteniendo un total de 88 UFP en un volumen de 400 μl para dicha dilución. Se calculó un título viral para la muestra original de 2.2×10^7 UFP/ml.

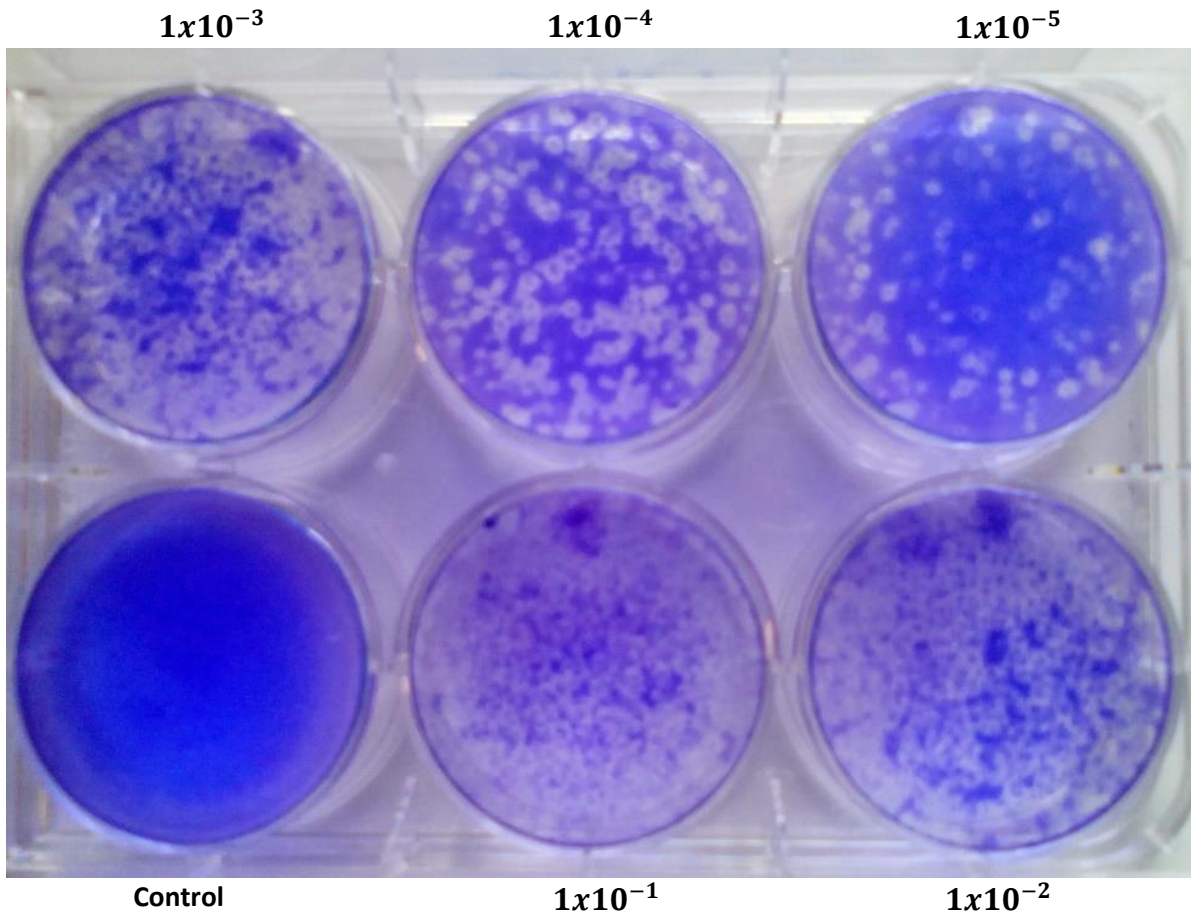


Figura 30. Titulación de placas líticas con el virus H5N2.

Para nuestros ensayos de inhibición del virus H1N1 con zanamivir y la molécula 3FSL se utilizaron 200 μl de medio (ver medio de infección en sección de métodos) de una dilución 1×10^{-5} (título viral 1.8×10^2 UFP/ml) obteniendo aproximadamente 36 UFP por pozo. Para los ensayos de inhibición del virus H5N2 se utilizó 165 μl de medio (200 μl totales ver medio de infección en sección de métodos) de una dilución 1×10^{-5} (título viral 2.2×10^2 UFP/ml) obteniendo aproximadamente 36 UFP por pozo.

INHIBICIÓN DE PLACAS LÍTICAS POR EL INHIBIDOR ZANAMIVIR

Se realizaron ensayos de inhibición de formación de placas líticas para ambos virus. Se usó zanamivir como control de inhibición. La reducción de placas líticas por zanamivir de las cepas de influenza A para células MDCK se encuentra entre 4nM y 14µM (Monto *et al.*, 1999). Otros autores mencionan que la IC_{50} aunque varía dependiendo de la cepa de virus y del tipo celular; un buen inhibidor no debería pasar de 10 µM. Se utilizaron concentraciones de 100, 200, 400, 600, 800, 1000, 1200, 1400, 1600, 1800, 2000, 2200, 2400, 2600, 2800, y 3000 nM. Para la cepa H1N1 se encontró una IC_{50} de 1128nM y para H5N2 la IC_{50} fue de 2607nM.

En las siguientes figuras: 31 y 33 podemos ver los resultados de las inhibiciones para H1N1 y H5N2 respectivamente. Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

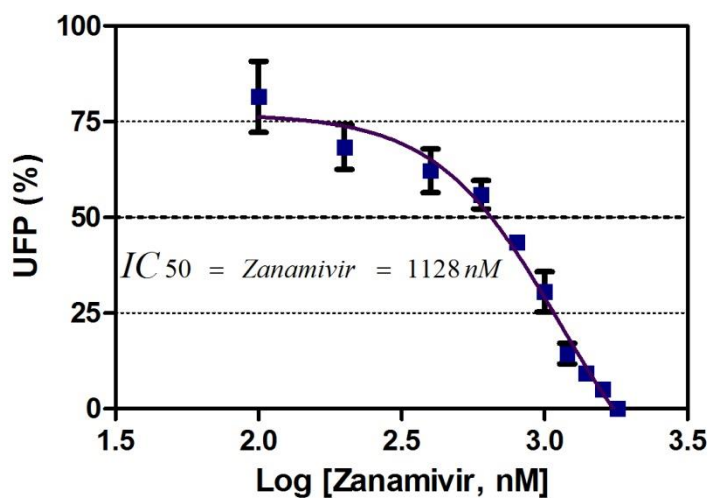


Figura 31. Inhibición de placas líticas de H1N1 por zanamivir. La línea punteada representa el 50% de la actividad de NA alcanzada. En este caso la IC_{50} fue de 1128 nM.

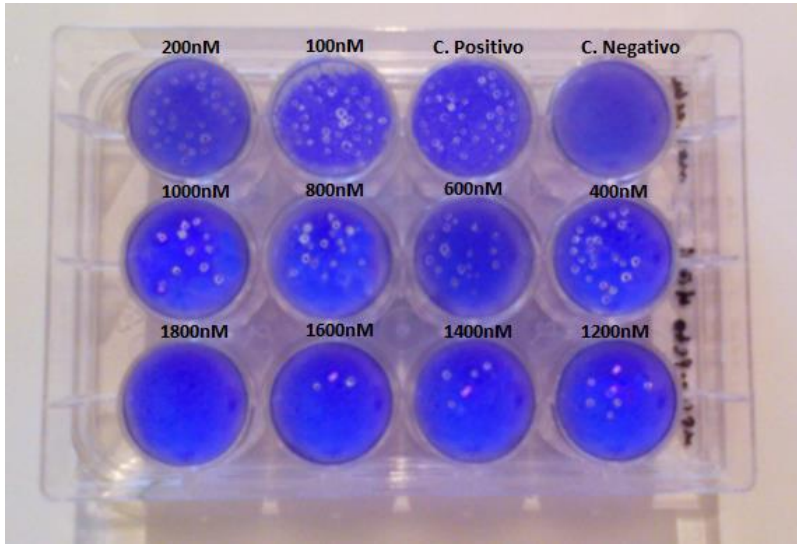


Figura 32. Inhibición de la formación de placas líticas de la cepa H1N1 por zanamivir. Se calculó la $IC_{50}=1128nM$

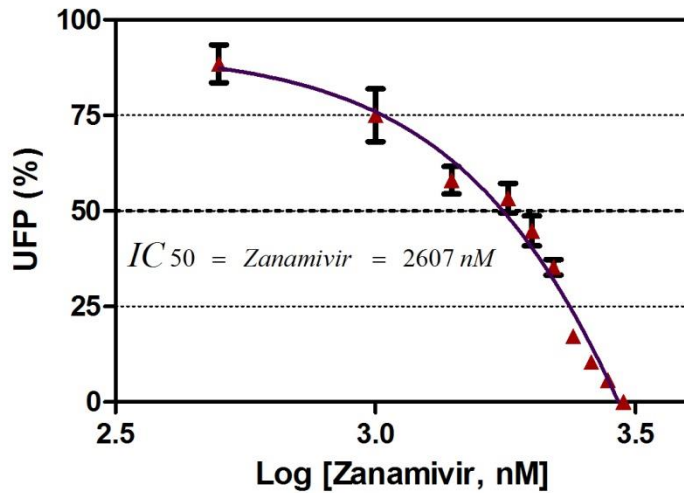


Figura 33. Inhibición de placas líticas de H5N2 por Zanamivir. La línea punteada representa el 50% de la actividad de NA alcanzada. En este caso la IC_{50} fue de 2607 nM.

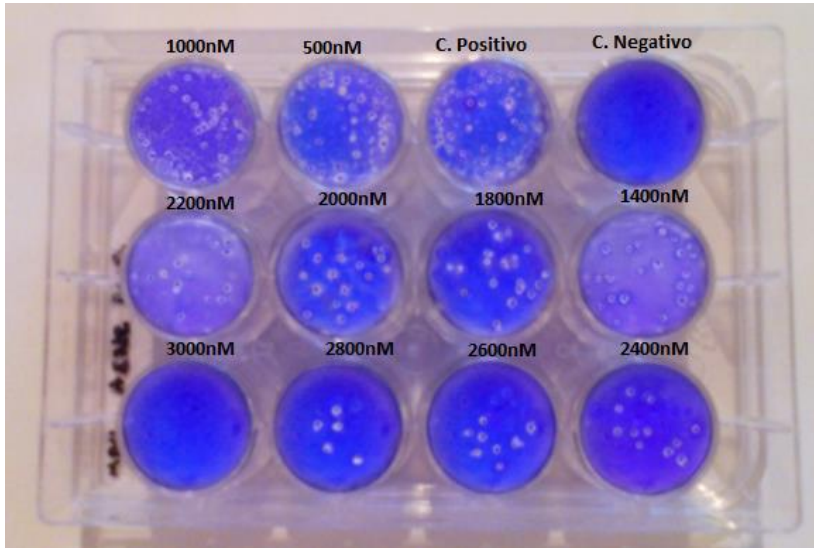


Figura 34. Inhibición de la formación de placas líticas de la cepa H5N2 por zanamivir. Se calculó la $IC_{50} = 2607nM$

ENSAYOS DE INHIBICIÓN DE PLACAS LÍTICAS POR EL INHIBIDOR 5FENIL SIALIL α 2,3 LACTOSA ALIL

Se utilizó zanamivir como control de inhibición y se probaron las siguientes concentraciones del inhibidor: 100, 500, 1000, 2000, 4000, 8000, 16000, 100,000 nM. Se tomó un mayor rango de inhibición esperando encontrar la cantidad de inhibición; sin embargo, aunque se tomó mayor cantidad del inhibidor para ambos casos no resultó en la inhibición de la formación de placas líticas, en la figura 35 podemos ver el resultado del ensayo de inhibición para H1N1 y en la figura 37 para H5N2.

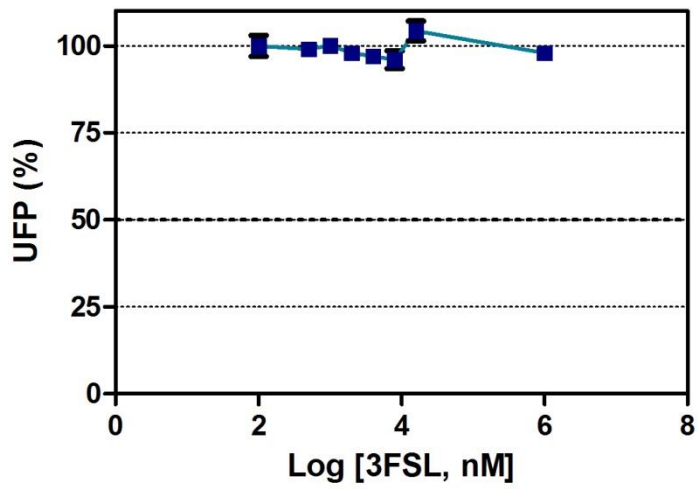


Figura 35. Ensayo de inhibición de placas líticas de H1N1 por 3FSL. La línea punteada representa el 50% de la actividad de NA alcanzada.

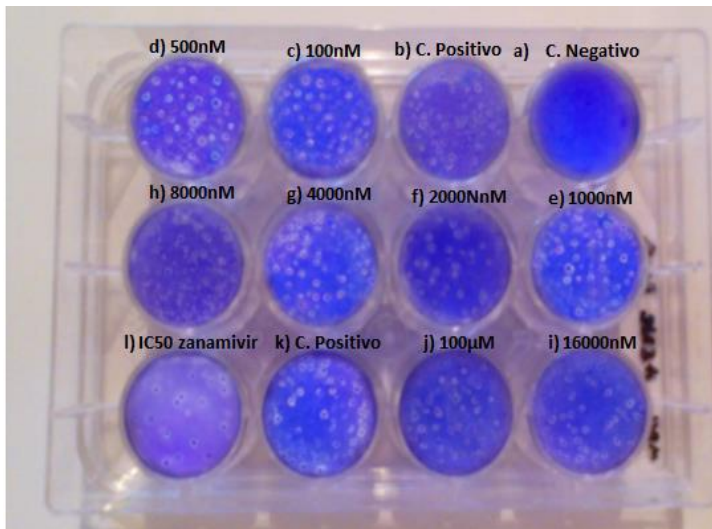


Figura 36. Ensayo de inhibición de la formación de placas líticas de la cepa H1N1 por la molécula 3FSL. (a-j). Inhibición por zanamivir (k-l).

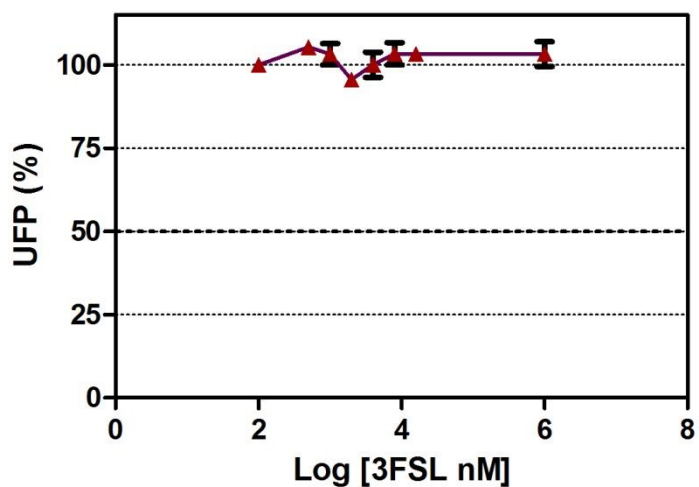


Figura 37. Ensayo de inhibición de placas líticas de H5N2 por 3FSL. La línea punteada representa el 50% de la actividad de NA alcanzada.

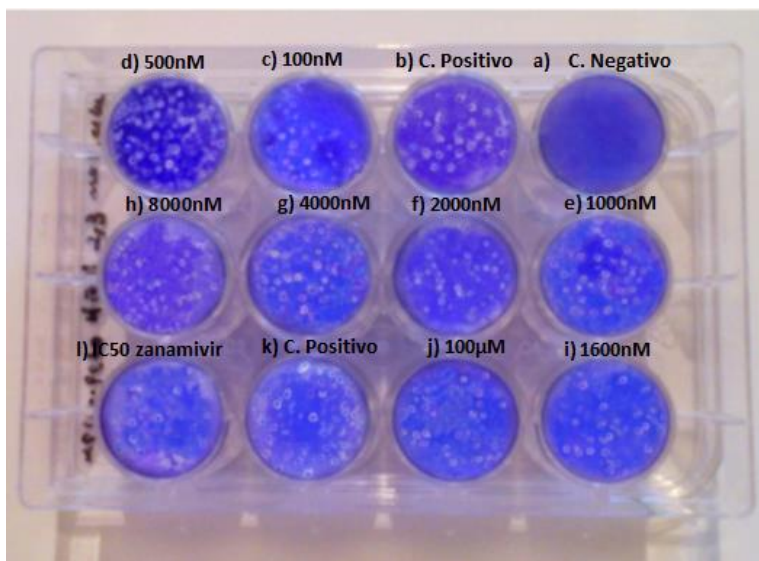


Figura 38. Ensayo de inhibición de la formación de placas líticas de la cepa H5N2 por la molécula 3FSL. (a-j). Inhibición por zanamivir (k-l).

DISCUSIÓN

Las propiedades de las neuraminidasas son desconocidas en muchos aspectos, a excepción de la resistencia a fármacos. Se sabe que la NA de virus humanos pandémicos son estables a bajos pH y que la mayoría de los virus estacionales son inestables, los virus que poseen una NA estable a pH bajos se replican más en comparación con los que no la poseen, la NA de virus de influenza aviar y algunos virus humanos pandémicos como el H1N1 de 1918, el H2N2 de 1957 y el H3N2 de 1968 son altamente estables a pH bajos (pH 5 o inferior) y la NA de la mayoría de los virus estacionales no lo son. La NA del virus de 1968 era estable pH bajo pero esta propiedad desapareció después de 1971 disminuyendo las infecciones por este virus, sugiriendo con esto que la estabilidad a bajos pH contribuye al surgimiento de pandemias, a la patogenicidad y a la rápida adaptación de virus humanos (Takagashi *et al.*, 2010).

En este trabajo nosotros probamos las condiciones ideales de pH y temperatura para realizar el ensayo de actividad de NA.

En cuanto al pH podemos decir que la cepa aviar H5N2 tuvo una actividad elevada entre 4 y 5.5 de pH. La cepa humana H1N1 tuvo una actividad elevada a un pH entre 4 y 5, casi igual que H1N1; sin embargo, para H1N1 a pH 5.5 la disminución de la actividad de NA es considerable, lo cual no sucede con H5N2 que sigue mostrando una actividad elevada como se observa en la Figura 16 (A y B) . Tanto la cepa H1N1 como la cepa H5N2 mostraron la mayor actividad a un pH de 4.5.

En las aves se encuentran diferentes pH a lo largo de su sistema digestivo (2-7.59), el virus pasa por la boca donde hay un pH de 6.75, atraviesa por el pH bajo de la molleja aproximadamente de 4.0 y luego pasan al intestino donde el pH es superior a 6.0 nuevamente, lo que podría explicar el mayor amplio rango de actividad por parte de la cepa H5N2 en comparación con la cepa H1N1 que tiene una menor tolerancia a pH más altos. Nuestros datos en cuanto al pH de la cepa H1N1 son consistentes con los obtenidos por Takagashi en 2001, que encontraron que en la mayoría de los aislados de seres humanos y cerdos la actividad de la NA disminuye por debajo de pH 4.5 (Takagashi *et al.*, 2001)

En un estudio realizado por Stallknecht y colaboradores se comparó la persistencia de la infectividad a diferente pH y salinidad, en un modelo de agua destilada y se encontró que los resultados eran consistentes con los obtenidos de las muestras de lagos donde se aislaron las cepas, sugiriendo que los resultados experimentales se pueden aplicar a condiciones de campo (Stallknecht *et al.*, 1990).

Podemos decir que las cepas utilizadas en este estudio están adaptadas a las condiciones de su hospedero lo cual se refleja en su actividad enzimática, y que además, son bastante estables a pH bajos.

En cuanto a la temperatura nuestros resultados sugieren que ambas cepas tienen mayor actividad de NA a 37°C lo cual ya se esperaba para el caso de H1N1 puesto que es una cepa de tipo humano y su mayor actividad a esta temperatura nos habla de un alto nivel de adaptación. Para H5N2 también encontramos mayor actividad a 37° lo cual no se esperaba puesto que la temperatura corporal en aves es mayor específicamente en el pollo es de 40-41°C. Sin embargo sí existen diferencias en cuanto al comportamiento de la actividad; al aumentar la temperatura en el caso de H1N1 también va aumentando la actividad y disminuye después de 37°C, lo cual no sucede con H5N2; en esta cepa observamos actividad elevada solo a 37°C, cabe destacar que el virus fue cultivado a esta temperatura, lo cual podría interferir en la elevada actividad a 37°C, además las células que se utilizaron para la infección en ambas cepas son de mamífero y no de ave. Al respecto, podría ser que las condiciones de laboratorio influyan en los resultados como una forma de adaptación.

En un trabajo efectuado con muestras de NA procedentes de virus aislados de patos migradores capturados en el noreste de Francia, así como de cerdos y humanos, mostraron una termoestabilidad máxima a 40° C. Para virus aislados de patos, la temperatura fue menor y menor aun la de los aislados de cerdos e intermedia para los aislados de seres humanos. En ese trabajo se plantea que esto es debido a un mecanismo adaptativo debido a que las aves se encuentran más expuestas a circunstancias desfavorables en el ambiente (Fiszon *et al.*, 1989)

De manera general, para las cepas de ambos virus se puede decir que su actividad comienza a aumentar a partir de los 25°C y que no toleran temperaturas mayores a 40°C, esto puede

explicarse debido a que el virus sobrevive en estas temperaturas que son las más comunes en el ambiente como se observa en la figura 17 (A y B).

Los reportes con los que se cuentan hasta este momento hablan de la especificidad que existe entre la HA de los virus humanos y aviarios por los receptores predominantes en su epitelio; sin embargo, hay pocos reportes que hablen sobre la especificidad de la NA por dichos enlaces.

En cuanto a los sustratos 3SL y 6SL probados en este trabajo se encontró que la cepa aviar muestra mayor actividad al interactuar con el sustrato 3SL, el enlace de esta molécula es más comúnmente encontrado en el aparato digestivo de las aves, sin embargo al interactuar con el sustrato 6SL también se observó actividad aunque fue menor. Estos resultados nos hablan de una preferencia de la cepa de tipo aviar sobre el sustrato del tipo 3SL no impidiendo con esto la capacidad de la cepa para hidrolizar el enlace del tipo 6SL. Desde el punto de vista epidemiológico, podría explicar el por qué los saltos intraespecie de aves y humanos.

Cuando se realizó el ensayo de actividad de NA, bajo las condiciones establecidas en la metodología, con la cepa de tipo humano con el sustrato 3SL no se encontró actividad de NA, lo que sugiere que la enzima de esta cepa no es capaz de reconocer este sustrato; sin embargo, cuando se utilizó el sustrato 6SL se encontró una alta actividad de NA. Lo que quiere decir que existe una preferencia de la enzima de esta cepa por el enlace 2,6. Lo cual no sucede con la cepa aviar.

Estos datos son interesantes puesto que coinciden con los reportes sobre la especificidad de reconocimiento de la HA, (3SL para los virus aviarios y 6SL para los virus humanos) (Rogers *et al.*, 1983; Couceiro *et al.*, 1993), sobre todo para la cepa de tipo humano. Para el virus es muy importante que la NA y la HA tengan la misma preferencia de enlace, pues si esto no sucediera así, la HA podría reconocer un determinado enlace específico en un sustrato y su NA otro, por lo tanto la escisión de la célula hospedera no se daría con la misma eficiencia al no reconocer ese enlace impidiendo con esto su diseminación. Se conoce que la HA necesita mutaciones compensatorias en la NA para mantener su virulencia. La especificidad de la HA puede cambiar del enlace $\alpha 2,3$ al $\alpha 2,6$, cuando un virus de influenza salta de un hospedero

aviar a uno humano, es de esperarse que este cambio vaya acompañado de un cambio similar en la especificidad de la NA. Estos cambios han sido evidenciados en los virus H2N2 y H3N2. La HA regula cambios en los aminoácidos del sitio de unión al receptor y la NA en los aminoácidos del sitio activo y en el tallo de la enzima, asegurando con esto un equilibrio óptimo en las actividades de estas dos moléculas. (Arias *et al.*, 2009).

Otro dato interesante con respecto a la adaptación de estos virus es que se ha encontrado en algunos estudios que la HA de los virus aviares también tienen capacidad de reconocer el enlace α 2,6 perdiendo especificidad por el enlace α 2,3 logrando de esta manera infectar humanos, (Gulati *et al.*, 2005), lo cual también coincide con lo encontrado para nuestra cepa de tipo aviar.

En cuanto a los ensayos de inhibición de la NA con zanamivir encontramos la IC50 a menor cantidad de este inhibidor para H1N1 que para H5N2 aproximadamente 13 veces más la concentración para H5N2 que para H1N1. Por otro lado los ensayos de inhibición con la molécula 3FSL no dieron resultado a pesar de utilizar diversas concentraciones, aun superando la cantidad que se agregó para zanamivir no encontramos inhibición.

Para el caso del inhibidor 6FSL la inhibición que podemos observar fue en una concentración mayor a la obtenida por zanamivir, sin embargo se probó aumentar la concentración de inhibidor sin obtener resultados favorables. Es posible que el tamaño de la molécula sea muy grande para establecer una interacción estable en el sitio activo de la enzima causando un impedimento estérico para la unión, además el ácido siálico como ya se había explicado con anterioridad es capaz de unirse a la NA del virus principalmente por sus grupos glicerol y carboxilato, de la misma manera que lo hacen zanamivir y oseltamivir, aunque este último reemplaza su grupo glicerol por un éster etílico. Sin embargo, este grupo al ser hidrofóbico puede unirse a otros sitios del sitio activo que no son precisamente los del fondo del sitio activo, que como se sabe tiene afinidad por moléculas hidrofílicas y por lo tanto las moléculas hidrófobas no son tan afines (Laver *et al.*, 1999). Sin embargo el carácter hidrofílico del oseltamivir le permite por otro lado atravesar la barrera digestiva. En cuanto a las moléculas que probamos podemos decir que no tuvo grandes efectos pues carece del grupo carboxilato el cual es un grupo polar y negativo que puede hacer enlaces con los aminoácidos positivos del sitio activo como son las argininas, otro factor que podría interferir es su grupo fenil el

cual es una porción hidrofóbica que no es afín a los aminoácidos del sitio activo y al poseer una alta polarizabilidad quizá esté uniéndose con mayor afinidad a las moléculas de agua y por lo tanto no cumple con la función de mantenerse unido al sitio activo y bloquear la unión del ácido siálico.

Estudiar las características químicas de las moléculas es importante puesto que nos ayudan a desarrollar nuevas moléculas que puedan funcionar como nuevos inhibidores, en el caso de inhibidores para el virus de la influenza, las moléculas de carga negativa y grupos funcionales polares pueden jugar el papel principal.

Por otro lado la NA de *V. cholerae* que se utilizó para probar previamente la inhibición por la molécula 3FSL en el laboratorio de Química y Biotecnología de Oligosacáridos (CERMAV-CNRS Francia) tiene características distintas a las que se encuentran en la NA de influenza; su sitio activo se compone de aminoácidos que en su mayoría no comparte con la NA viral (R224 R37 R118 E756 E619 Y740 W311 D250), estas diferencias entre la NA del virus de influenza y la NA de *V. cholerae* son interesantes a comparar, ya que en la bacteria, la molécula 3SLA si mostró inhibición en la actividad de NA.

Al hacer el análisis de las secuencias del sitio activo de las enzimas podemos observar que los aminoácidos a los que se une el ácido siálico a la N1 y N2 difieren en los residuos P327, y Y406, por lo que es lógico pensar que suceda lo mismo con los sustratos 3SL y 6SL, que además tienen distintos enlaces. Estos sustratos se comportan diferentes según el tipo de enlace con el que está unido lo que también podría explicar por qué dichas enzimas tienen diferente actividad no sólo al cambiar los sustratos; sino también al cambiar el pH y la temperatura. Seguramente estas diferencias en cuanto a los aminoácidos del sitio activo en ambas cepas se habrían notado en el comportamiento de la inhibición de haber podido observarse, es decir; el inhibidor con enlace 2,3 inhibiría más a las cepas de tipo aviar y el inhibidor con enlace 2,6 inhibiría más a la cepa tipo humano. Sería interesante hacer un estudio *in silico* para saber a qué aminoácidos están asociados los cambios en el sitio activo que interfieren con la estabilidad a la temperatura y pH, así como del reconocimiento de sustratos e inhibidores.

En cuanto al ensayo de placas líticas, no se observó un efecto inhibitor, por lo que podemos deducir, que dado que el tiempo de infección fue el mismo tiempo que se le dio al inhibidor, que la molécula no interfiere en la interacción del virus con la célula. Faltaría probar la interacción de la molécula con el virus a diferentes tiempos de incubación previa y de esta manera poder observar si la molécula es capaz de unirse y bloquear la acción de la enzima antes de la infección.

De manera general, el objetivo de esta tesis fue probar moléculas que pudieran inhibir la replicación del virus de influenza A; sin embargo, las moléculas que se probaron en este trabajo no funcionaron, pues las pruebas de inhibición de neuraminidasa dieron resultados negativos, y en ningún caso con ambas cepas y con ambas moléculas se obtuvo inhibición de la actividad enzimática, así mismo al probar la inhibición usando un cultivo celular tampoco logramos tener una reducción de las placas líticas.

CONCLUSIONES

OBJETIVO 1

De las condiciones ideales de reacción de la NA con ácido siálico podemos decir que para ambas cepas las condiciones de temperatura y pH ideales son las mismas; 37°C y un pH de 4.5, aunque los rangos de temperatura y pH varíen para ambas cepas, para H1N1 la temperatura va de 25-40°C y el pH de 4.0-5.0; para H5N2 la temperatura va de 30-40°C y el pH de 4.0-5.5.

OBJETIVO 2

En cuanto a la especificidad de las neuraminidasas por los sustratos se determinaron diferencias, para el caso de la cepa H1N1 hay una clara preferencia por el sustrato 6SL. En el caso de la cepa H5N2 no hay especificidad ya que se observa actividad con ambos sustratos 6SL y 3SL, pero sí una preferencia por el sustrato 3SL.

OBJETIVO 3

Sobre la determinación de la inhibición de las neuraminidasas por las moléculas análogas para 3FSL no encontramos inhibición en ningún caso; sin embargo, con 6FSL hay una ligera disminución de la actividad aunque no mayor a la encontrada por el control zanamivir.

OBJETIVO 4

La molécula 3FSL que se probó en este trabajo no mostró inhibición de la infección en cultivo celular para las cepas H1N1 y H5N2.

PERSPECTIVAS

1. Determinar la especificidad de la hemaglutinina sobre los sustratos para las cepas H1N1 y H5N2 y analizar la relación que guarda con la especificidad de sus neuraminidasas.
2. Probar el efecto inhibitor de la molécula 6FSL en cultivo celular para ambas cepas. Realizar más experimentos con diferentes concentraciones de 6FSL en el rango en que se encontró disminución de la actividad de neuraminidasa.
3. También es importante si los resultados de inhibición son buenos realizar ensayos con muestras clínicas de influenza además de las cepas de referencia.
4. Analizar mediante un trabajo *in silico* el efecto que tienen los dos aminoácidos distintos encontrados en ambas cepas en el análisis de la secuencia.
5. Desarrollar nuevos fármacos tomando en cuenta las características de las moléculas que hemos probado.

ANEXOS

Tabla 4. Preparación de los reactivos para el ensayo de NA.

Reactivos para ensayo de actividad de NA.		
Reactivo	Preparación	Cantidad por reacción (μl)
Ácido peryódico 25 mM en HCl 125 mM	57 mg/ 10 ml de HCl 125 mM. HCl 125mM: 104 μl HCl/ 10 ml de agua	50
Meta arsenito de sodio 2% en HCl .5 M	.2 g/10ml de HCl .5 M HCl .5 M: 415 μL HCl/ 10 ml de agua	40
Ácido tiobarbitúrico .1 M pH 9	.1441 g/ 10 ml con agua	200
HCl 10.5 M al 5.7% en N-butanol	HCl 10.5 M: 872 uL HCl/1 ml de agua. 570 μl de HCl 10.5 M / 10 ml de butanol.	500
Fetuína	1ml/ml de fetuína	50
Amortiguador	pH 4.5 1M	50

ALINEAMIENTO MÚLTIPLE DE LAS SECUENCIAS DEL GEN DE LA N1 DE LA CEPA A/HUMAN/PUERTORICO/8/1934 H1N1 Y DEL GEN N2 DE LA CEPA A/CHICKEN/MEXICO/31381-7/1994 H5N2.

El porcentaje de identidad fue del 43.28%

```

neuraminidasa1      MNPNQKIITIGSICLVVGLISLILQIGNIISIWISHSIQT----GSQNHTGICNQNIITY
neuraminidasa2      MNPNQKIITIGSASLTITATVCFMQIAILTTTTLHFKQNECSIPANNQVVPCEPIIE-
*****          .*. . . . . : : : : * . . . . : : * : **
neuraminidasa1      KNSTWVKDTTSVILTGNSLCPIRGWAIYSKDNSIRIGSKGDVFIREFPFISCSHLECRT
neuraminidasa2      RN-----IDYRNWSKPQCQITGFAPFSKDNSIRLSAGGNIWITREFPYVSCDTSKCYQ
:*          . . . * * * :*****. . : * : : : * : : * : *
neuraminidasa1      FFLTQGALLNDRHSNGTVKDRSPYALMSCPVGAEAPSPYNSRFESVAWSASACHDGMGWL
neuraminidasa2      FALGQGTTLDNKHSNGTIHDIRIPRTLLMNELGV-PFHLGTKQVCVAWSSSSCHDGKAWL
* * * * : * : : * * : * * * : * * * : * * * : * * * : * * *
neuraminidasa1      TIGISGPDNGAVAVLKYNGIITETIKSWRKKILRTOESECACVNGSCFTIMTDGPSDGLA
neuraminidasa2      HVCVTGDDRNATASFIYDGMVLVDSIGSWSQNIILRTOESECVCINGTCTVVMTDGSASGKA
: : * * . * * : * : * : * * : * * * : * * * : * * * : * * *
neuraminidasa1      SYKIFKIEKGVTKSIELNAPNSHYEECSYCPDTGKVMCVCRDNWHGNSRPWVSFDQ-NL
neuraminidasa2      DTRILFVKEGKVVHISPLSGSAQHVEECYPRYPNVRCVCRDNWKGNSRPVIDINMADY
. : * : : * * : * . . * * * * * : * * * * * : * * * : : :
neuraminidasa1      DYQIGYICSGVFGDNPRPKDGTGS---CGPVYVDGANGVKGFSYRYGNGVWIGRTKSHSS
neuraminidasa2      SIDSSYVCSGLVGDTPRNDDSSSSNCRDPNNERGNLGVKGWAFDNGDDVVMGRTISKDS
. : * : * * : * * * . * : * * * * * : : * : * * * * : *
neuraminidasa1      RHGFEMIWDPNGWETETDSKFSV-RQDVVAMTDWSGYSGSFVQHPELTGLDCIRPCFVVEL
neuraminidasa2      RSGYETFRVIGGWAIANSKSQTNRQVIVDNNNWSGSGIFSV----ENKSCINRCFYVEL
* * * : * * : : * * . * * : * . : * * * * * * * . * . * * * *
neuraminidasa1      IRGRPKEKTIW-TSASSISFCGVNSDITVDWSWPDGAELPFTIDK
neuraminidasa2      IRGRPQETRWWTSNSIVVFCGTSPTYGTGSWPDGANINFMPI-
***** : * * * : * * . . . * * * * : *

```


	Color	Aminoácidos
Aminoácidos del sitio activo para N1	Azul	R118,E119,D151,R152,R156,W178,E227,E276,E277,R292,R371
Aminoácidos del sitio activo para N2	Rojo	R118,D151,R152,E276,R292,P327,R371,Y406
Aminoácidos descritos en cepas H1N1 que su mutación causa resistencia	Rosa	V116 I117 E119 Q136 K150 D151 R152 R156 W178 S179 D198 I222 E227 H274 E277 R292 N294 E425
Aminoácidos descritos en cepas H5N2 que su mutación causa resistencia	Amarillo	E119 Q136 D151 R152 R156 W178 S179 D198 I222 E227 H274 E277 R292 N294 E425 I149V
Mutaciones encontradas para H1N1	Verde	I149V
Mutaciones encontradas para H5N2	-----	-----

REFERENCIAS

- Adams, M. J., King, A. M. Q., & Carstens, E. B. (2013). Ratification vote on taxonomic proposals to the International Committee on Taxonomy of Viruses (2013). *Archives of virology*, 158(9), 2023-2030.
- Aminoff, D. (1961). Methods for the quantitative estimation of N-acetylneuraminic acid and their application to hydrolysates of sialomucoids. *biochem. J*, 81(2), 384.
- Arias, C. F., Escalera-Zamudio, M., de los Dolores Soto-Del, M., Cobián-Güemes, A. G., Isa, P., & López, S. (2009). Molecular anatomy of 2009 influenza virus A (H1N1). *Archives of medical research*, 40(8), 643-654.
- Aymard-Henry, M., Coleman, M. T., Dowdle, W. R., Laver, W. G., Schild, G. C., & Webster, R. G. (1973). Influenzavirus neuraminidase and neuraminidase-inhibition test procedures. *Bulletin of the World Health Organization*, 48(2), 199.
- Babu, Y. S., Chand, P., Bantia, S., Kotian, P., Dehghani, A., El-Kattan, Y., ... & Montgomery, J. A. (2000). BCX-1812 (RWJ-270201): discovery of a novel, highly potent, orally active, and selective influenza neuraminidase inhibitor through structure-based drug design. *Journal of medicinal chemistry*, 43(19), 3482-3486.
- Baum, E. Z., Wagaman, P. C., Ly, L., Turchi, I., Le, J., Bucher, D., & Bush, K. (2003). A point mutation in influenza B neuraminidase confers resistance to peramivir and loss of slow binding. *Antiviral research*, 59(1), 13-22.
- Birikaki, L., Pradeau, S., Armand, S., Priem, B., Márquez-Domínguez, L., Reyes-Leyva, J., ... & Fort, S. (2015). Chemoenzymatic Syntheses of Sialylated Oligosaccharides Containing C5-Modified Neuraminic Acids for Dual Inhibition of Hemagglutinins and Neuraminidases. *Chemistry-A European Journal*, 21(30), 10903-10912.
- Cann, A. J. (2005). *Principles of Molecular Virology (Standard Edition)*. Academic Press.
- Carter, J., & Saunders, V. A. (2007). *Virology: principles and applications*. John Wiley & Sons.
- Chand, P., Kotian, P. L., Dehghani, A., El-Kattan, Y., Lin, T. H., Hutchison, T. L., ... & Montgomery, J. A. (2001). Systematic structure-based design and stereoselective synthesis of novel multisubstituted cyclopentane derivatives with potent antiinfluenza activity. *Journal of medicinal chemistry*, 44(25), 4379-4392.
- Chen, H., Cheung, C. L., Tai, H., Zhao, P., Chan, J. F., Cheng, V. C., ... & Yuen, K. Y. (2009). Oseltamivir-resistant influenza A pandemic (H1N1) 2009 virus, Hong Kong, China. *Emerg Infect Dis*, 15(12), 1970-2.
- Chen, J., Lee, K. H., Steinhauer, D. A., Stevens, D. J., Skehel, J. J., & Wiley, D. C. (1998). Structure of the hemagglutinin precursor cleavage site, a determinant of influenza pathogenicity and the origin of the labile conformation. *Cell*, 95(3), 409-417.
- Chen, R., & Holmes, E. C. (2006). Avian influenza virus exhibits rapid evolutionary dynamics. *Molecular biology and evolution*, 23(12), 2336-2341.
- Collins, P. J., Haire, L. F., Lin, Y. P., Liu, J., Russell, R. J., Walker, P. A., ... & Gamblin, S. J. (2008). Crystal structures of oseltamivir-resistant influenza virus neuraminidase mutants. *Nature*, 453(7199), 1258-1261.
- Colman, P. M., Hoyne, P. A., & Lawrence, M. C. (1993). Sequence and structure alignment of paramyxovirus hemagglutinin-neuraminidase with influenza virus neuraminidase. *Journal of virology*, 67(6), 2972-2980.

- Colman, P. M., Varghese, J. N., & Laver, W. G. (1983). Structure of the catalytic and antigenic sites in. *Nature*, 303, 41.
- Couceiro, J. N. S., Paulson, J. C., & Baum, L. G. (1993). Influenza virus strains selectively recognize sialyloligosaccharides on human respiratory epithelium; the role of the host cell in selection of hemagglutinin receptor specificity. *Virus research*, 29(2), 155-165.
- Cox, N. J., & Subbarao, K. (2000). Global epidemiology of influenza: past and present. *Annual review of medicine*, 51(1), 407-421.
- del Campo, J. A. C. F. (2006). Inhibidores de la neuraminidasa y nuevas estrategias terapéuticas frente al virus de la gripe. *Monografías de la Real Academia Nacional de Farmacia*.
- Dugan, V. G., Chen, R., Spiro, D. J., Sengamalay, N., Zaborsky, J., Ghedin, E., ... & Taubenberger, J. K. (2008). The evolutionary genetics and emergence of avian influenza viruses in wild birds. *PLoS Pathog*, 4(5), e1000076.
- Ellström, P., Latorre-Margalef, N., Griekspoor, P., Waldenström, J., Olofsson, J., Wahlgren, J., & Olsen, B. (2008). Sampling for low-pathogenic avian influenza A virus in wild Mallard ducks: oropharyngeal versus cloacal swabbing. *Vaccine*, 26(35), 4414-4416.
- Fiszon, B., Hannoun, C., Garcia-Sastre, A., Villar, E., & Cabezas, J. A. (1989). Comparison of biological and physical properties of human and animal A (H1N1) influenza viruses. *Research in virology*, 140, 395-404.
- Gagneux, P., Cheriyan, M., Hurtado-Ziola, N., van der Linden, E. C. B., Anderson, D., McClure, H., ... & Varki, N. M. (2003). Human-specific regulation of α 2-6-linked sialic acids. *Journal of Biological Chemistry*, 278(48), 48245-48250.
- Garcia-Sastre, A., Villar, E., Hannoun, C., & Cabezas, J. A. (1989). Sialidase activity in rimantadine-resistant and-sensitive influenza A viruses. *Enzyme*, 43(4), 207-211.
- Garten, R. J., Davis, C. T., Russell, C. A., Shu, B., Lindstrom, S., Balish, A., ... & Donis, R. (2009). Antigenic and genetic characteristics of swine-origin 2009 A (H1N1) influenza viruses circulating in humans. *science*, 325(5937), 197-201.
- Goto, H., & Kawaoka, Y. (1998). A novel mechanism for the acquisition of virulence by a human influenza A virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(17), 10224-10228.
- Gubareva, L. V., Kaiser, L., & Hayden, F. G. (2000). Influenza virus neuraminidase inhibitors. *The Lancet*, 355(9206), 827-835.
- Gulati, U., Wu, W., Gulati, S., Kumari, K., Waner, J. L., & Air, G. M. (2005). Mismatched hemagglutinin and neuraminidase specificities in recent human H3N2 influenza viruses. *Virology*, 339(1), 12-20.
- Hale, B. G., Randall, R. E., Ortín, J., & Jackson, D. (2008). The multifunctional NS1 protein of influenza A viruses. *Journal of General Virology*, 89(10), 2359-2376.
- Holmes, E. C., Ghedin, E., Miller, N., Taylor, J., Bao, Y., StGeorge, K., ... & Taubenberger, J. K. (2005). Whole-genome analysis of human influenza A virus reveals multiple persistent lineages and reassortment among recent H3N2 viruses. *PLoS biology*, 3(9), 1579.
- Horgan, I. E. (1981). A modified spectrophotometric method for determination of nanogram quantities of sialic acid. *Clinica Chimica Acta*, 116(3), 409-415.
- Horimoto, T., & Kawaoka, Y. (2005). Influenza: lessons from past pandemics, warnings from current incidents. *Nature Reviews Microbiology*, 3(8), 591-600.

- Kim, C. U., Lew, W., Williams, M. A., Wu, H., Zhang, L., Chen, X., ... & Stevens, R. C. (1998). Structure-activity relationship studies of novel carbocyclic influenza neuraminidase inhibitors. *Journal of medicinal chemistry*, *41*(14), 2451-2460.
- Korteweg, C., & Gu, J. (2008). Pathology, molecular biology, and pathogenesis of avian influenza A (H5N1) infection in humans. *The American journal of pathology*, *172*(5), 1155-1170.
- Krauss, S., Walker, D., & Webster, R. G. (2012). Influenza virus isolation. In *Influenza Virus* (pp. 11-24). Humana Press
- Kundu, A., Avalos, R. T., Sanderson, C. M., & Nayak, D. P. (1996). Transmembrane domain of influenza virus neuraminidase, a type II protein, possesses an apical sorting signal in polarized MDCK cells. *Journal of Virology*, *70*(9), 6508-6515.
- Lamb, R. A., & Krug, R. M. (2001). Orthomyxoviridae: the viruses and their replication. *Fields virology*: p. 1487–1531. *Fields virology, 4th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.*
- Landolt, G. A., & Olsen, C. W. (2007). Up to new tricks—a review of cross-species transmission of influenza A viruses. *Animal Health Research Reviews*, *8*(01), 1-21.
- Laver, W. G., Bischofberger, N., & Webster, R. G. (1999). Disarming flu viruses. *Scientific American*, *280*(1), 78-87.
- McLaughlin, M. M., Skoglund, E. W., & Ison, M. G. (2015). Peramivir: an intravenous neuraminidase inhibitor. *Expert opinion on pharmacotherapy*, *16*(12), 1889-1900.
- Meindl, P., Bodo, G., Palese, P., Schulman, J., & Tuppy, H. (1974). Inhibition of neuraminidase activity by derivatives of 2-deoxy-2, 3-dehydro-N-acetylneuraminic acid. *Virology*, *58*(2), 457-463.
- Mishin, V. P., Hayden, F. G., & Gubareva, L. V. (2005). Susceptibilities of antiviral-resistant influenza viruses to novel neuraminidase inhibitors. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *49*(11), 4515-4520.
- Monto, A. S., Fleming, D. M., Henry, D., De Groot, R., Makela, M., Klein, T., ... & Man, C. Y. (1999). Efficacy and safety of the neuraminidase inhibitor zanamivir in the treatment of influenza A and B virus infections. *Journal of Infectious Diseases*, *180*(2), 254-261.
- Nicholls, J. M., Chan, R. W., Russell, R. J., Air, G. M., & Peiris, J. M. (2008). Evolving complexities of influenza virus and its receptors. *Trends in microbiology*, *16*(4), 149-157.
- Okomo-Adhiambo, M., Sleeman, K., Ballenger, K., Nguyen, H. T., Mishin, V. P., Sheu, T. G., ... & Gubareva, L. V. (2010). Neuraminidase inhibitor susceptibility testing in human influenza viruses: a laboratory surveillance perspective. *Viruses*, *2*(10), 2269-2289.
- Ong, A. K., & Hayden, F. G. (2007). John F. Enders lecture 2006: antivirals for influenza. *Journal of Infectious Diseases*, *196*(2), 181-190.
- Organización Mundial de la Salud. (2005). *Manual de Bioseguridad en el Laboratorio*. World Health Organization.
- Palese, P., & Compans, R. W. (1976). Inhibition of influenza virus replication in tissue culture by 2-deoxy-2, 3-dehydro-N-trifluoroacetylneuraminic acid (FANA): mechanism of action. *Journal of General Virology*, *33*(1), 159-163.
- Palese, P., & Shaw, M. L. (2007). *Fields virology. Orthomyxoviridae: The Viruses and Their Replication, 5th edn, Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins, Wolters Kluwer Business*, 1647-1689.

- Pizzorno, A., Abed, Y., & Boivin, G. (2011, August). Influenza drug resistance. In *Seminars in respiratory and critical care medicine* (Vol. 32, No. 4, pp. 409-422).
- Ramirez-Gonzalez, J. E., Gonzalez-Duran, E., Alcantara-Perez, P., Wong-Arambula, C., Olivera-Diaz, H., Cortez-Ortiz, I, ... & Alpuche-Aranda, C. (2011). Oseltamivir-resistant pandemic (H1N1) 2009 virus, Mexico. *Emerging infectious diseases*, 17(2), 283.
- Rogers, G. N., Paulson, J. C., Daniels, R. S., Skehel, J. J., Wilson, I. A., & Wiley, D. C. (1983). Single amino acid substitutions in influenza haemagglutinin change receptor binding specificity. *Nature*, 304(5921), 76-78.
- Salazar, M. I., López-Ortega, O., León-Ávila, G., Ramírez-González, J. E., & Castro-Mussota, M. E. (2010). El origen de la variabilidad genética de los virus de la influenza. *Gac Méd Méx*, 146(3), 199-207.
- Sammalkorpi, M., & Lazaridis, T. (2007). Configuration of influenza hemagglutinin fusion peptide monomers and oligomers in membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1768(1), 30-38.
- Samson, M., Pizzorno, A., Abed, Y., & Boivin, G. (2013). Influenza virus resistance to neuraminidase inhibitors. *Antiviral research*, 98(2), 174-185.
- Santos-López, G., Flores, E., Baños, R., Herrera-Camacho, I., & Reyes-Leyva, J. (2004). Purification of the Porcine rubulavirus attachment protein by liquid isoelectric focusing. *Protein expression and purification*, 35(1), 120-125.
- Scholtissek, C., Rohde, W. V., Von Hoyningen, V., & Rott, R. (1978). On the origin of the human influenza virus subtypes H2N2 and H3N2. *Virology*, 87(1), 13-20.
- Stallknecht, D. E., & Shane, S. M. (1988). Host range of avian influenza virus in free-living birds. *Veterinary research communications*, 12(2-3), 125-141.
- Stallknecht, D. E., Kearney, M. T., Shane, S. M., & Zwank, P. J. (1990). Effects of pH, temperature, and salinity on persistence of avian influenza viruses in water. *Avian diseases*, 412-418.
- Strauss, E. G., & Strauss, J. H. (2007). *Viruses and human disease*. Academic Press.
- Strauss, E. G., & Strauss, J. H. (2007). *Viruses and human disease*. Academic Press.
- Sun, S., Wang, Q., Zhao, F., Chen, W., & Li, Z. (2011). Glycosylation site alteration in the evolution of influenza A (H1N1) viruses. *PloS one*, 6(7), e22844.
- Sun, X., Shi, Y., Lu, X., He, J., Gao, F., Yan, J., ... & Gao, G. F. (2013). Bat-derived influenza hemagglutinin H17 does not bind canonical avian or human receptors and most likely uses a unique entry mechanism. *Cell reports*, 3(3), 769-778.
- Swayne, D. E. (2007). Understanding the complex pathobiology of high pathogenicity avian influenza viruses in birds. *Avian diseases*, 51(s1), 242-249.
- Takahashi, T., Kurebayashi, Y., Ikeya, K., Mizuno, T., Fukushima, K., Kawamoto, H., ... & Suzuki, T. (2010). The low-pH stability discovered in neuraminidase of 1918 pandemic influenza A virus enhances virus replication. *PloS one*, 5(12), e15556.
- Takahashi, T., Suzuki, Y., Nishinaka, D., Kawase, N., Kobayashi, Y., Kazuya, I. P., ... & Suzuki, T. (2001). Duck and human pandemic influenza A viruses retain sialidase activity under low pH conditions. *Journal of biochemistry*, 130(2), 279-283.
- Taubenberger, J. K., & Kash, J. C. (2010). Influenza virus evolution, host adaptation, and pandemic formation. *Cell host & microbe*, 7(6), 440-451.
- Taubenberger, J. K., & Kash, J. C. (2010). Influenza virus evolution, host adaptation, and pandemic formation. *Cell host & microbe*, 7(6), 440-451.

- Taubenberger, J. K., & Morens, D. M. (2009). Pandemic influenza—including a risk assessment of H5N1. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)*, 28(1), 187.
- Téllez-Sosa, J., Rodríguez, M. H., Gómez-Barreto, R. E., Valdovinos-Torres, H., Hidalgo, A. C., Cruz-Hervert, P., ... & Martínez-Barnetche, J. (2013). Using high-throughput sequencing to leverage surveillance of genetic diversity and oseltamivir resistance: a pilot study during the 2009 influenza A (H1N1) pandemic.
- Tiralongo, J., & Martinez-Duncker, I. (Eds.). (2013). *Sialobiology: Structure, Biosynthesis and Function. Sialic Acid Glycoconjugates in Health and Disease* (Vol. 1). Bentham Science Publishers.
- Tolentino-Lopez, L., Segura-Cabrera, A., Reyes-Loyola, P., Zimic, M., Quiliano, M., Briz, V., ... & Correa-Basurto, J. (2013). Outside-binding site mutations modify the active site's shapes in neuraminidase from influenza A H1N1. *Biopolymers*, 99(1), 10-21.
- Viswanathan, K., Koh, X., Chandrasekaran, A., Pappas, C., Raman, R., Srinivasan, A., ... & Sasisekharan, R. (2010). Determinants of glycan receptor specificity of H2N2 influenza A virus hemagglutinin. *PLoS One*, 5(10), e13768.
- von Itzstein, M., Wu, W. Y., Kok, G. B., Pegg, M. S., Dyason, J. C., Jin, B., ... & Penn, C. R. (1993). Rational design of potent sialidase-based inhibitors of influenza virus replication. *Nature*, 363(6428), 418-423.
- Wagner, R., Heuer, D., Wolff, T., & Klenk, H. D. (2001, October). N-glycans attached to hemagglutinin in the head region and the stem domain control growth of influenza viruses by different mechanisms. In *International Congress Series* (Vol. 1219, pp. 375-382). Elsevier.
- Wahlgren, J. (2011). Influenza A viruses: an ecology review. *Infection ecology & epidemiology*, 1.
- Wang, M. Z., Tai, C. Y., & Mendel, D. B. (2002). Mechanism by which mutations at His274 alter sensitivity of influenza A virus N1 neuraminidase to oseltamivir carboxylate and zanamivir. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 46(12), 3809-3816.
- Webster, R. G., Bean, W. J., Gorman, O. T., Chambers, T. M., & Kawaoka, Y. (1992). Evolution and ecology of influenza A viruses. *Microbiological reviews*, 56(1), 152-179.
- Webster, R. G., Yakhno, M., Hinshaw, V. S., Bean, W. J., & Murti, K. C. (1978). Intestinal influenza: replication and characterization of influenza viruses in ducks. *Virology*, 84(2), 268-278.
- Wise, H. M., Foeglein, A., Sun, J., Dalton, R. M., Patel, S., Howard, W., & Anderson, E. C. Barclay 679 WS, Digard P. 2009. A complicated message: identification of a novel PB1-related protein 680 translated from influenza A segment 2 mRNA. *J. Virol*, 83, 8021-8031.
- Wright, P., & Neumann, G. Kawaoka. 2012. Orthomyxoviruses. *Fields virology, 6th ed. Philadelphia (PA): Lippincott Williams & Wilkins*, 1186-1243.
- Yamada, S., Suzuki, Y., Suzuki, T., Le, M. Q., Nidom, C. A., Sakai-Tagawa, Y., ... & Kawaoka, Y. (2006). Haemagglutinin mutations responsible for the binding of H5N1 influenza A viruses to human-type receptors. *Nature*, 444(7117), 378-382.
- Yu, H., Yu, H., Karpel, R., & Chen, X. (2004). Chemoenzymatic synthesis of CMP-sialic acid derivatives by a one-pot two-enzyme system: comparison of substrate flexibility of three microbial CMP-sialic acid synthetases. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 12(24), 6427-6435.

Zepeda, H. M., Perea-Araujo, L., Zarate-Segura, P. B., Vázquez-Pérez, J. A., Miliar-García, Á., Garibay-Orijel, C., ... & García-Cavazos, R. J. (2010). Identification of influenza A pandemic (H1N1) 2009 variants during the first 2009 influenza outbreak in Mexico City. *Journal of Clinical Virology*, 48(1), 36-39.