



Docking molecular en las proteínas PB1, PB2 y PA del virus de la Influenza A (H1N1) a partir de secuencias de aminoácidos reportadas en Suramérica durante el periodo 2000 a 2017.

UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
PROGRAMA DE BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO
TRABAJO DE GRADO
BOGOTÁ, 2019



Docking molecular en las proteínas PB1, PB2 y PA del virus de la Influenza A (H1N1) a partir de secuencias de aminoácidos reportadas en Suramérica durante el periodo 2000 a 2017.

Jairo Andrés Ayala García

Paula Andrea Malagón Osorio

Asesor

Bs. Esp. Mauricio Humberto Rodríguez Panduro

Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca
Facultad de Ciencias de la Salud
Programa Bacteriología y Laboratorio Clínico
Bogotá, 2019

A Dios por permitirnos completar este proyecto y permitir convertirnos en profesionales.

A nuestras familias por ser nuestro apoyo incondicional en cada paso de nuestras carreras.

A la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca por permitirnos crecer profesionalmente

Al profesor Mauricio Humberto Rodríguez Panduro, por habernos sembrado el interés en este proyecto desde su clase, por haber creído en nosotros y en este proyecto, por su guía, paciencia y su acompañamiento.

TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	14
OBJETIVOS	16
1. ANTECEDENTES	17
2. MARCO REFERENCIAL	22
2.1. VIRUS DE LA INFLUENZA	22
2.2. HISTORIA DE LA INFLUENZA	24
2.3. BIOLOGÍA MOLECULAR DEL VIRUS DE LA INFLUENZA A (H1N1)	27
2.3.1. ENZIMA ARN POLIMERASA DEPENDIENTE DE ARN (RdRp)	27
2.3.2. HEMAGLUTININA	30
2.3.3. NUCLEOPROTEÍNA	31
2.3.4. NEURAMINIDASA	31
2.3.5. PROTEÍNAS M1 Y M2	32
2.3.6. PROTEÍNAS NS1 Y NS2	33
2.4. REPLICACIÓN DEL VIRUS	33
2.5. ASPECTOS CLÍNICOS	35
2.6. DIAGNÓSTICO	37
2.7. RESPUESTA INMUNE	40
2.8. VACUNAS	42
2.9. ANTIVIRALES	44
2.10. ACOPLAMIENTO O DOCKING MOLECULAR	45
3. DISEÑO METODOLÓGICO	46
3.1. UNIVERSO, POBLACIÓN Y MUESTRA	46
3.2. HIPÓTESIS Y VARIABLES	46
3.2.1. HIPÓTESIS	46
3.2.2. VARIABLES	47
3.3. TÉCNICAS Y PROCEDIMIENTOS	47
3.3.1. TÉCNICAS	47
3.3.2. PROCEDIMIENTOS	49

4. RESULTADOS	51
4.1. CONSERVACIÓN DE SECUENCIAS DE AMINOÁCIDOS DE LOS SEGMENTOS 1, 2 Y 3 DEL VIRUS DE LA INFLUENZA A (H1N1)	51
4.1.1. SEGMENTO 1	52
4.1.2. SEGMENTO 2	52
4.1.3. SEGMENTO 3	53
4.1.4. PROTEÍNAS PB1, PB2 Y PA	53
4.2. DOCKING MOLECULAR	54
4.2.1. ALINEACIÓN MÚLTIPLE DE PROTEÍNAS RECEPTORAS CRISTALIZADAS	54
4.2.2. MOLÉCULAS LIGANDO	56
5. DISCUSIÓN	65
6. CONCLUSIONES	69
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70
ANEXOS	

ÍNDICE DE IMÁGENES

Imagen 1. Estructura Antigénica del Virus de la Influenza.....	21
Imagen 2. Proteína 4J2R / PB2.....	52
Imagen 3. Proteína 5DES / PA.....	52
Imagen 4. Proteína 2ZTT / PB1-PB2.....	52
Imagen 5. Ligando 5,6-difenil-N-piperidin-1-ilpirazina-2-carboxamida.....	55
Imagen 6. Ligando 5,6-bis (4-clorofenil) – N- piperidin- ilpirazina- 2- carboxamida.....	55
Imagen 7. Ligando 2- oxo- 1H- pirazina-3-carboxamida.....	56
Imagen 8. Ligando 6-oxo- 1H- pirazina – 3-carboxamida.....	56
Imagen 9. Ligando [1-(2-amino-7-metil-4-oxo-7,8-dihidro-3H-pteridin-6-il)] etil- (4-aminofenil)-1-deoxi-5- [1-alfa-D-ribofuranosil trifosfato]- D-ribitol	56
Imagen 10. Interacción del receptor 4J2R con el ligando 5,6-difenil-N-piperidin-1-ilpirazina-2-carboxamida	56
Imagen 11. Interacción del receptor 4J2R con el ligando 5,6-bis (4-clorofenil) – N-piperidin- ilpirazina- 2- carboxamida	56
Imagen 12. Interacción del receptor 4J2R con el ligando 2- oxo- 1H- pirazina-3-carboxamida.....	57
Imagen 13. Interacción del receptor 4J2R con el ligando 6-oxo- 1H- pirazina – 3-carboxamida	57
Imagen 14. Interacción del receptor 4J2R con el ligando [1-(2-amino-7-metil-4-oxo-7,8-dihidro-3H-pteridin-6-il)] etil- (4-aminofenil)-1-deoxi-5-[1-alfa-D-ribofuranosil trifosfato]- D-ribitol.....	57
Imagen 15. Interacción del receptor 5DES con el ligando 5,6-difenil-N-piperidin-1-ilpirazina-2-carboxamida.....	58
Imagen 16. Interacción del receptor 5DES con el ligando 5,6-bis (4-clorofenil) – N-piperidin- ilpirazina- 2- carboxamida.....	58

Imagen 17. Interacción del receptor 5DES con el ligando 2- oxo- 1H- pirazina-3- carboxamida.....	59
Imagen 18. Interacción del receptor 5DES con el ligando 6-oxo- 1H- pirazina – 3- carboxamida.....	59
Imagen 19. Interacción del receptor 5DES con el ligando [1-(2-amino-7-metil-4-oxo-7,8- dihidro-3H-pteridin-6-il)] etil- (4-aminofenil)-1-deoxi-5-[1-alfa-D-ribofuranosil trifosfato]- D-ribitol.....	59
Imagen 20. Interacción del receptor 2ZTT con el ligando 5,6-difenil-N-piperidin-1- ilpirazina-2-carboxamida.....	60
Imagen 21. Interacción del receptor 2ZTT con el ligando 5,6-bis (4-clorofenil) – N- piperidin- ilpirazina- 2- carboxamida.....	60
Imagen 22. Interacción del receptor 2ZTT con el ligando 2- oxo- 1H- pirazina-3- carboxamida.....	61
Imagen 23. Interacción del receptor 2ZTT con el ligando 6-oxo- 1H- pirazina – 3- carboxamida.....	61
Imagen 24. Interacción del receptor 2ZTT con el ligando [1-(2-amino-7-metil-4-oxo-7,8- dihidro-3H-pteridin-6-il)] etil- (4-aminofenil)-1-deoxi-5-[1-alfa-D-ribofuranosil trifosfato]- D-ribitol.....	61

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Segmentos del virus de la Influenza A, B y C.....	22
Tabla 2. Variables dependientes e independientes de la investigación.	44
Tabla 3. Porcentaje de conservación de secuencias de aminoácidos de la proteína PB2 del virus de la Influenza A (H1N1).	77
Tabla 4. Alineación de los aminoácidos de la proteína PB2 del virus de la Influenza A (H1N1).	79
Tabla 5. Porcentaje de conservación de secuencias de aminoácidos de la proteína PB1 del virus de la Influenza A (H1N1)	82
Tabla 6. Alineación de los aminoácidos de la proteína PB1 del virus de la Influenza A (H1N1).....	84
Tabla 7. Porcentaje de conservación de secuencias de aminoácidos de la proteína PA del virus de la Influenza A (H1N1)	87
Tabla 8. Alineación de los aminoácidos de la proteína PA del virus de la Influenza A (H1N1).	90
Tabla 9. Porcentaje total de conservación y variabilidad de las proteínas PB1, PB2 y PA del virus de la Influenza A (H1N1).....	51
Tabla 10. Estructuras cristalizadas de las proteínas receptoras del virus de la Influenza A (H1N1)	52
Tabla 11. Secuencias conservadas de la molécula cristalizada 2ZTT / PB1-PB2.....	53
Tabla 12. Secuencias conservadas de la proteína cristalizada 4J2R / PB2.....	53
Tabla 13. Secuencias conservadas de la proteína cristalizada 5DES / PA.....	53

Tabla 14. Porcentaje de similitud en las secuencias de las proteínas cristalizadas 2ZTT / PB1 PB2, 4J2R / PB2 y 5des / PA.....	54
Tabla 15. Moléculas obtenidas como posibles ligando.....	55
Tabla 16. Afinidad e interacciones del receptor 4J2R con cada molécula ligando.....	56
Tabla 17. Afinidad e interacciones del receptor '5DES' con cada molécula ligando.....	58
Tabla 18. Afinidad e interacciones del receptor '2ZTT' con cada molécula ligando.	60



Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca
Facultad de Ciencias de la Salud
Programa de Bacteriología y Laboratorio Clínico

RESUMEN

La enfermedad por virus de la Influenza, es uno de los eventos epidemiológicos que año tras año, genera gran interés en salud pública debido a su fácil propagación entre los seres humanos. Es causada principalmente por el virus de la Influenza A (H1N1), un virus de la familia *Orthomyxoviridae* que tiene su material genético de tipo ARN segmentado de carga negativa, el cual está dividido en ocho segmentos que codifican las distintas proteínas que conforman la estructura y funcionamiento del virus. Es caracterizada por presentar sintomatología respiratoria común como tos, fiebre, adinamia, rinorrea y cefalea.

Esta investigación tuvo como objetivo la generación de acoplamiento molecular entre una molécula ligando capaz de bloquear la acción de la enzima ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRp) conformada por las proteínas PB1, PB2 y PA, para poder evitar la replicación del virus. Para esto fue necesario determinar las secuencias de aminoácidos conservadas de las proteínas PB1, PB2 y PA, obtenidas en bases de datos del Centro Nacional para la Información Biotecnológica-NCBI, las cuales se alinearon, analizaron y acoplaron con 5 ligandos por medio de herramientas bioinformáticas como Muscle, Unipro Ugene, AutoDock Vina, entre otros.

Los resultados de este estudio arrojaron que la enzima RdRp, presenta una alta conservación en su conformación de aminoácidos, con porcentajes de 95,5%, 93,9% y 96,0%. Además de ello, se logró determinar que el derivado 5,6-difenil-N-piperidin-1-ilpirazina-2-carboxamida es un ligando óptimo para hacer el docking, con una afinidad de -8,0, -7,9 y -8,6 Kcal/mol

respectivamente con las proteínas PB1, PB2 y PA. Se logra concluir que es posible generar acoplamiento molecular en las proteínas que conforman la enzima RdRp del virus de la Influenza A (H1N1), con ligandos análogos del antiviral favipiravir; en miras de un futuro estudio experimental para lograr un fármaco para el tratamiento antiviral de la enfermedad por virus de la Influenza A (H1N1).

Palabras clave: Influenza, virus, docking, receptor, ligando, bioinformática.

Estudiantes: Jairo Andrés Ayala García, Paula Andrea Malagón Osorio

Docente: Bs. Esp. Mauricio Humberto Rodríguez Panduro- Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca

INTRODUCCIÓN

La enfermedad por virus de la Influenza, es uno de los eventos epidemiológicos que año tras año, genera gran interés en salud pública debido a su fácil propagación entre los seres humanos. Afecta principalmente el sistema respiratorio manifestándose con tos, rinorrea, faringitis, expectoración, astenia y cefalea; en una fase avanzada puede intervenir en el sistema gastrointestinal causando diarrea, vómito, fiebre y náuseas.⁴⁴ Ha sido una enfermedad que ha marcado la historia por su alta diseminación y transmisibilidad, causando pandemias como la ‘gripe española’ en 1918, la Influenza asiática en 1957, la ‘gripe de Hong Kong’ en 1968 y la más reciente la ‘gripe porcina’ en 2009;³ por lo que este proyecto pretende ser una herramienta académico-informativa concerniente al virus de la Influenza A (H1N1), pues produce una enfermedad de comportamiento epidemiológico lo que hace que sea de gran interés en salud pública por su fácil diseminación, siendo Suramérica un gran foco de transmisión debido a los altos índices de migración entre países.²³

La enfermedad por virus de la Influenza es causada en su mayoría por el virus de la Influenza A (H1N1) el cual es un virus de la familia *Orthomyxoviridae*, tiene material genético de tipo ARN segmentado de carga negativa, el cual está dividido en ocho segmentos que codifican las distintas proteínas estructurales (PB1, PB2, PA, hemaglutinina, nucleoproteína, neuraminidasa, M1 y M2) y no estructurales (NS1 y NS2),^{20,21} permitiendo la conformación de la cápside viral y la replicación del virus. Para la replicación del virus, por su naturaleza genética es indispensable la expresión y funcionamiento de la enzima ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRp); la cual es codificada por los segmentos 1, 2 y 3 del virus de la Influenza A (H1N1).³⁵

Los procedimientos para el desarrollo de esta investigación se fundamentan en el uso de herramientas bioinformáticas como Muscle, Unipro Ugene, AutoDock Tools, AutoDock Vina y Discovery Studio, para demostrar el porcentaje de conservación de secuencias de aminoácidos de la enzima RdRp del virus de la Influenza A (H1N1) y de esta manera se pueda establecer una clasificación de conservación en: altamente conservada (95- 100%), conservada (80-95%), variable (30-80%) y altamente variable (0-30%).^{76,86} Adicional a ello, para lograr visualizar las posibles interacciones ligando (molécula farmacológica) - receptor (proteínas de la enzima RdRp

del virus), buscando la interacción con mayor afinidad para tener una alternativa farmacológica que bloquee la replicación del virus de la Influenza A (H1N1).^{96,97}

El desarrollo de esta investigación inicia con una recopilación histórica de la Influenza en Suramérica; seguido de la caracterización del virus de la Influenza como agente infeccioso, su composición estructural y genómica, su fisiología molecular y el ciclo replicativo. Posterior a esto, se brinda una visión de aspectos clínicos de la enfermedad, así como de la respuesta inmune, en la que se esclarece la forma de cómo el virus de la Influenza interviene en la evasión de esta respuesta cuando se presentan cambios genéticos y su diagnóstico. También se dispone una actualización de datos en vacunas y antivirales vigentes para el tratamiento de la enfermedad por virus de la Influenza, estipuladas desde el Centro de Control de Enfermedades- CDC.^{62,63}

La metodología utilizada en esta investigación es de tipo bioinformático descriptivo, pues el análisis de estos resultados responden a una identificación y comparación de secuencias conservadas del virus de la Influenza A (H1N1) de los años 2000 a 2017 en el continente suramericano, con el fin de identificar compuestos antivirales que actúen sobre estas secuencias conservadas que potencialmente inhiban la acción de la enzima RdRp en la replicación del virus de la Influenza A (H1N1) y así poder disminuir el impacto epidemiológico que la Influenza conlleva. Esto es posible gracias a herramientas bioinformáticas que permiten la visualización de las alineaciones múltiples, así como el reconocimiento de las posibles interacciones que estos compuestos antivirales tengan con las proteínas que conforman la enzima RdRp del virus de la Influenza A (H1N1).^{96,97} Por lo tanto, esta investigación se basó en el análisis de secuencias de los segmentos conservados de la enzima ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRp), con la finalidad de generar una alternativa farmacológica hacia el tratamiento de la Influenza, por medio de una propuesta de docking molecular con una molécula de uso farmacológico que pueda bloquear la acción de esta enzima, por medio del análisis bioinformático de las proteínas PB1, PB2 y PA del virus de la Influenza A(H1N1).

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Generar un acoplamiento molecular en la enzima RdRp del virus de la Influenza A (H1N1) a partir del análisis bioinformático de secuencias de aminoácidos de las proteínas PB1, PB2 y PA, reportadas en la base de datos del NCBI en Suramérica entre el periodo 2000 a 2017.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar las regiones genómicas conservadas de las proteínas PB1, PB2 y PA del virus de la Influenza A (H1N1) por medio de herramientas bioinformáticas.
- Determinar ligandos que permitan la interacción en las secuencias de aminoácidos conservadas de las proteínas PB1, PB2 y PA del virus de la influenza A (H1N1).
- Establecer las interacciones entre las moléculas ligando y los residuos de aminoácidos de las proteínas PB1, PB2 y PA del virus de la Influenza A (H1N1).

1. ANTECEDENTES

La Influenza tiene una gran importancia epidemiológica debido a su capacidad de diseminación entre personas, provocando enfermedad en grandes masas. Se estima que desde el año 1510 a la fecha han ocurrido 31 pandemias; entre los años 1830 a 1833 se logra definir que esta tiene un comportamiento epidemiológico por lo que se convierte en un foco de estudio. Sin embargo a partir de 1918 con la ‘gripe española’, se consideró que la enfermedad es de fácil expansión y de altos índices de mortalidad, ya que causó la muerte de aproximadamente 40 millones de personas.²² En años posteriores el virus de la Influenza presentó una baja virulencia, hasta 1957 con el surgimiento de la gripe asiática ocasionada por el virus A (H2N2) y la gripe de Hong Kong en 1968 a causa del virus A (H3N2), otras epidemias se registraron en Rusia y Europa durante noviembre y diciembre en los períodos de 1986 a 1989.³

En el año 2009, el virus de la Influenza A H1N1 reemerge en la población, con la denominación de ‘gripe porcina’; con un foco inicial en México en el mes de abril con brotes de enfermedades respiratorias y aumento en los reportes de hasta 10,262 casos de síndromes respiratorios.³ En la ciudad de Chihuahua informaron una tasa de mortalidad de 0.96 por cada 100,000 habitantes; en la población vulnerable, mayores de 65 años y niños menores de un año, la mortalidad fue de 130 a 160 muertes por 100.000 habitantes.³ La enfermedad por virus de la Influenza se diseminó a países latinoamericanos como Perú, donde la enfermedad se extendió a los 24 departamentos. Se notificaron 1.11 muertes por 100.000 habitantes y la tasa de letalidad fue de 3.09 muertes por cada 100 casos confirmados.⁴

En Argentina, en la semana epidemiológica 31 del año 2009 se confirmaron 6.768 casos positivos para el nuevo virus de influenza pandémica A (H1N1)⁵. En Brasil para junio del mismo año se presentaron 2.051 muertes confirmadas por virus de la influenza A (H1N1)⁶. En Chile para octubre del 2009 se notificaron 367.041 casos de enfermedad tipo influenza y de estos, 12.252 fueron confirmados por técnicas de biología molecular y finaliza el año con incidencia de enfermedad tipo influenza nacional de 2,7 por 100.000 habitantes^{7,8}

El último reporte de la OPS/OMS de actualización regional de Influenza, para la semana epidemiológica del 6 a 19 de febrero 2019 en Suramérica, para Bolivia el 0,20% de los casos de

hospitalización por Infección Respiratoria Aguda Grave (IRAG), eran positivos para Influenza. Para Ecuador la actividad de la Influenza disminuyó y permaneció sobre el umbral estacional, con un porcentaje menor del 5% de muestras positivas de los casos reportados por IRAG. En Chile el 40% de casos de IRAG reportados eran positivos para Influenza, con un reporte de muestras positivas de <5% en <100 casos reportados.⁹ En Argentina durante la semana epidemiológica 3, la Influenza disminuyó en comparación con semanas anteriores, con un bajo porcentaje de muestras positivas para Influenza, dando el 2% en 200 casos estudiados. En Brasil durante la semana epidemiológica 6, se detectó un descenso de los casos positivos para Influenza a menos de 50.

Para el reporte de la Dirección de Epidemiología y Demografía del Ministerio de salud de Colombia actualizado en junio del 2018, los casos de enfermedades respiratorias son frecuentes. Durante el año 2017 se notificaron 6.955.075 de consultas médicas y urgencias por IRAG y 244.143 hospitalizaciones con el mismo diagnóstico. Del 32.6% de las muestras positivas de los pacientes hospitalizados y ambulatorios (4.110/12.610), el 19.7 % eran positivas para virus de la Influenza y el 1.7% de las muestras eran positivas para Influenza A(H1N1). En la semana epidemiológica 4 del 2019, de aproximadamente 100 casos que se han reportado, el 10% de estos han sido positivos para Influenza A (H1N1).⁹

El virus de la influenza A (H1N1) es el agente patógeno que causa la Influenza, una enfermedad de gran importancia en salud pública. Es uno de los virus que pertenece a la familia *Orthomyxoviridae*, el cual según la clasificación Baltimore pertenece al grupo V. Se caracteriza por tener ARN de cadena sencilla de carácter negativo y su material genómico está dividido en ocho segmentos que codifican para diez proteínas, ocho de ellas son proteínas estructurales: la polimerasa básica 1 (PB1), polimerasa básica 2 (PB2), polimerasa ácida (PA), hemaglutinina (HA), nucleoproteína (NP) y neuraminidasa (NA); y dos de ellas son proteínas no estructurales (NS1, NS2). La secuenciación de estos segmentos es lo que permite ordenar los aminoácidos de estas proteínas en cadenas ¹ para su posterior análisis.

Para la generación de proteínas estructurales y no estructurales del virus de la Influenza A (H1N1), cada segmento del material genómico es el encargado de codificar una ellas; el

segmento uno codifica la proteína polimerasa básica 2 (PB2) encargada de la iniciación de la transcripción. El segmento dos codifica la proteína polimerasa básica 1 (PB1), encargada de la elongación del ARN. El segmento tres codifica la proteína polimerasa ácida (PA), encargada de la finalización de la actividad proteasa, junto a las dos proteínas anteriores.² Estas tres proteínas se conocen con el nombre de ‘complejo de la polimerasa o transcriptasa viral’ la cual es importante para la replicación del virus. El segmento cuatro codifica la proteína hemaglutinina (HA), caracterizada por ser una proteína de fusión al encargarse de la unión al receptor galactosa del ácido siálico de la célula, lo que le da el carácter antigénico al virus. El segmento cinco codifica la proteína NP o nucleoproteína viral, encargada de la unión del complejo transcriptasa y el transporte de este al núcleo celular. El segmento seis codifica la proteína neuroaminidasa (NA), cuya función es inmunogénica y promueve la liberación del virus. El segmento siete codifica las proteínas M1 y M2, las cuales se encargan de la fusión de membranas, siendo la proteína M2 la encargada de permitir la apertura de los canales iónicos de la célula. Por último, el segmento ocho codifica las dos proteínas no estructurales del virus, NS1 y NS2, las cuales se encargan de la exportación o el transporte de ARN celular.²

Los virus de la Influenza se identifican en cinco géneros: Influenza A, influenza B, influenza C, Thogotovirus e Isavirus, estos evolucionan al tener cambios genéticos debido dos fenómenos: shift antigénico, que consiste en el reordenamiento genético del virus debido a su genoma segmentado que da nuevos subtipos de virus y drift antigénico, que consiste en la mutación de los segmentos genómicos 4 y 6, que codifican para las proteínas hemaglutinina y neuroaminidasa respectivamente; generando un cambio de aminoácidos y por ende un cambio conformacional y estructural para modificar el sitio antigénico de la glicoproteína y teniendo como resultado la modificación del antígeno resultante haciendo que la variabilidad antigénico del virus aumente. Este proceso le otorga al virus resistencia antivirales como zanamivir y peramivir , que son conocidas por su interacción con la neuraminidasa del virus de la Influenza¹¹ lo que dificulta el tratamiento de la enfermedad con estos antrivirales. Esto promueve la búsqueda de alternativas farmacológicas para el tratamiento de la enfermedad, buscando receptores con un blanco molecular o diana farmacológica conservada, gracias a la bioinformática que permite investigar un mejor blanco para el fármaco a través del alineamiento

de secuencias y el docking molecular, se podría proponer y encontrar un mejor receptor para las sustancias y compuestos en investigación.

El análisis de secuencias y la relación entre las mismas se puede hacer con diversos modelos analíticos como la inferencia de filogenias con métodos computacionales, el cual tiene muchas aplicaciones importantes en medicina, biología e investigación, el descubrimiento de fármacos y la biología de la conservación.¹² El análisis de la conservación genética en organismos vivos se realiza por medio de la alineación de nucleótidos o aminoácidos, en donde las secuencias se organizan en una matriz que se fundamenta en la creación de columnas de manera homóloga, con una posición primaria original para comparar las secuencias resultantes en sitios conservados y variables.

La comparación de secuencias permite identificar posiciones homólogas y regiones variables, con la ayuda de dos formatos en texto plano para representación de secuencias como el formato FASTA, que se puede encontrar en todas las bases de datos virtuales. Este formato es interpretado en programas como Muscle y UniproUgene que permiten una alineación por relación homóloga y analizar relaciones entre secuencias^{13,14}. En el área de virología es de gran importancia ya que de esta manera, se organizan y analizan las agrupaciones de genomas virales promoviendo la alimentación de bases de datos o mediante la reconstrucción de las filogenias con secuencias de referencia para cada uno de los segmentos¹⁵ con el fin de tener un registro detallado para futuras investigaciones o predicciones de brotes epidemias del virus de la Influenza A (H1N1), como factor de importancia a nivel de salud pública.

La bioinformática en las ciencias médicas tiene múltiples usos, como por ejemplo en la industria farmacéutica, la cual incursiona en la investigación de alternativas farmacológicas que puedan servir en el tratamiento de enfermedades; por medio de procesos computacionales que se enfocan en la generación y análisis de información derivada de estructuras tridimensionales y dinámicas de proteínas¹⁶. Uno de estos procesos se conoce como ‘docking’ cuyo término es usado para los esquemas computacionales resultantes, que intenta encontrar la mejor coincidencia entre proteínas y ligandos. Este es un método óptimo para la estructuración, el descubrimiento y el diseño de moléculas con potencial farmacológico, cuyo objetivo es encontrar el mejor

acoplamiento entre ligandos.^{16,18} Esto se logra gracias al uso de bases de datos internacionales, pues en ellas está contenida la información resultante de procesos experimentales de secuenciación genética de distintos agentes, como por ejemplo las herramientas UniGene¹⁷, International Nucleotide Sequence Database Collaboration, GenBank del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI), Banco de Datos de ADN de Japón (DDBJ) y el Laboratorio Europeo de Biología Molecular (EMBL), bases de datos que brindan la oportunidad de tener un compilado nutrido de información genética, cuya utilización puede utilizarse con herramientas bioinformáticas que generan nuevo conocimiento científico aplicado a la solución de problemas de salud pública.

2. MARCO REFERENCIAL

2.1. VIRUS DE LA INFLUENZA

El virus de la influenza hace parte a la familia *Orthomyxoviridae*, definidos en cinco géneros: Influenza A, influenza B, influenza C, Thogotovirus e Isavirus. Son de forma esférica, aunque a veces se pueden encontrar virus de forma pleomorfa o filamentosa y estos pueden medir entre 80 hasta 120nm de diámetro (Imagen 1)

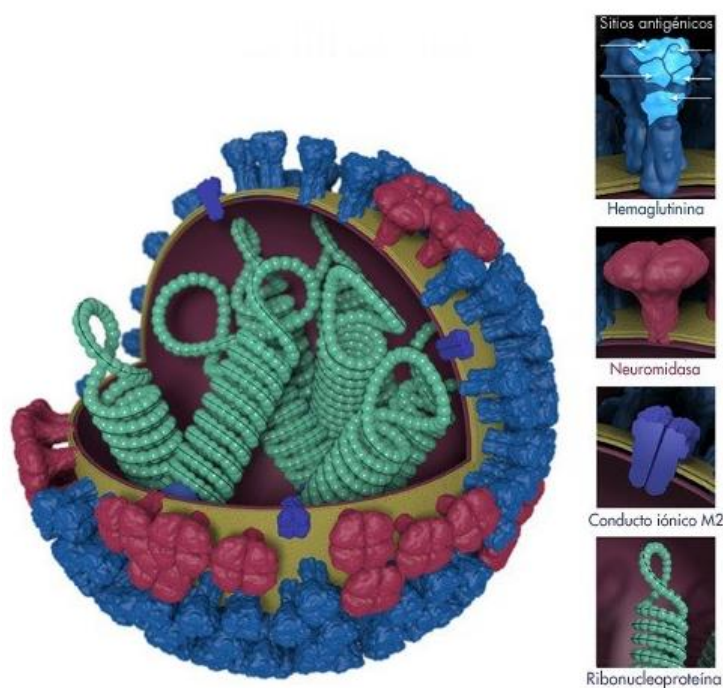


Imagen 1. Virus de la Influenza con su caracterización antigénica. (img tomada de: <https://espanol.cdc.gov/enes/flu/professionals/laboratory/antigenic.htm>)

Su genoma es de tipo ARN de cadena sencilla segmentado de carga negativa, que contiene aproximadamente 13.500 nucleótidos distribuidos en ocho segmentos que están ubicados en un intervalo de 890- 2340 nucleótidos y cada segmento codifica para una o dos proteínas ^{19,20}. Hace parte del grupo V de la clasificación Baltimore, ya que su genoma al ser una cadena simple de ARN con carga negativa necesita de una conversión a ARNm de carga positiva para que sea

posible realizar su proceso de replicación.²¹ La respectiva función de sus proteínas codificantes por cada segmentos se pueden observar en la tabla 1.

Tabla 1. Segmentos del virus de la Influenza A, B y C. (Referencias: Real Academia Nacional de Farmacia. SciELO)

SEGMENTOS DE LOS VIRUS DE LA INFLUENZA A, B y C						
SEGMENTO	PROTEINA EN INFLUENZA A	PROTEINA EN INFLUENZA B	PROTEINA EN INFLUENZA C	NUMERO DE NUCLEOTIDOS	NUMERO DE AMINOACIDOS	FUNCION
1	PB2	PB1	P1	2320	759	Es la proteína de unión a la región 5'cap del ARNm. Determina la iniciación de la transcripción y hace parte del complejo polimerasa y de la conformación de la enzima RdRp.
2	PB1	PB2	P2	2341	757	Es la proteína que tiene actividad en la elongación o la polimerización y hace parte del complejo polimerasa y de la conformación de la enzima RdRp.
3	PA	PA	P3	2211	716	Es la proteína que tiene actividad en la replicación con actividad proteolítica y hace parte del complejo polimerasa y de la conformación de la enzima RdRp.
4	HA	HA	HE	1757	Entre 566	Es una proteína de función encargada de la unión al receptor celular, siendo altamente antigénica e inmunogénica
5	NP	NP	NP	1540	498	Es una nucleoproteína de unión al ARN. Permite el transporte del complejo polimerasa al núcleo celular.
6	NA	NA-NB	M	1392	Entre 454	Es una proteína que promueve la liberación del virus y se caracteriza por su antigenicidad e inmunogenicidad.
7	M1	M1	NS1	1005	252	Es la proteína más abundante del virus encargada de la unión de la nucleocápside a la membrana
	M2	M2	NS2	315	96	Es la proteína encargada de la fusión de membranas gracias a la apertura de canales iónicos
8	NS1	NS1	-	868	Entre 230	Es la proteína encargada de hacer el empalme y la traducción. Modula la expresión génica y es considerada una proteína anti interferón.
	NS2	NS2	-	395	121	Es la proteína encargada de exportar el ARN de la nucleocápside.

PB: Polimerasa Básica. PA: Polimerasa Ácida. HA: Hemaglutinina. NP: Nucleoproteína. NA: Neuraminidasa. M: Membrana. NS: No estructural.

Los virus de la Influenza A y B tienen en común su afectación a los seres humanos, los cuales causan epidemias estacionales de la enfermedad durante las temporadas de baja temperatura. Las infecciones de influenza tipo C causan generalmente una enfermedad respiratoria leve y no se considera que desencadenen epidemias. Los virus de influenza D afectan principalmente al ganado y no se cree que puedan causar infecciones o enfermedades en los seres humanos.⁷⁷ Su

genoma es segmentado y codifica para distintas proteínas como se puede observar en la tabla 1. Los virus de la Influenza tipos A y B tienen 8 segmentos genómicos a diferencia del virus tipo C que tiene 7 segmentos genómicos.

La nomenclatura para los virus de la Influenza fue publicada y adoptada en el boletín informativo de la Organización Mundial de la Salud en el año 1980 58(4):585-591 (1980) teniendo en cuenta los siguientes componentes ⁷⁷

- El tipo antigénico: A, B o C
- El hospedador de origen: Porcino, equino, aviar, etc. (Teniendo en cuenta que no hay hospedador de origen para los virus de origen humano)
- El origen geográfico
- El número de la cepa
- El año de aislamiento
- Para los virus de la Influenza A, se describe en paréntesis los antígenos H (hemaglutinina) y N (neuraminidasa) acompañado del número de H o N que corresponda, por ejemplo, A (H1N1)

2.2. HISTORIA DE LA INFLUENZA

La Influenza ha sido de las enfermedades más importantes de la historia de la humanidad, pues su potencial epidemiológico ha generado pandemias mortales de difícil manejo, lo que la convierte en una enfermedad de gran interés en salud pública. Comenzó en la primavera en Rusia en lo que se extendió por toda Europa en 6 meses y se expandió en todo el mundo en 3 años, con tasas altas de mortalidad no específicas. En 1781 se data una segunda pandemia originaria en China en la época de otoño; la cual se diseminó a Rusia y extensivamente hacia toda Europa durante 8 meses. Se determinó que esta pandemia tenía una alta tasa de infectividad y extensibilidad que llegó a América del Norte en los primeros meses de infección afectando principalmente a los adultos jóvenes y se estimó que diariamente en San Petersburgo hubo

30.000 infectados, más del 50% de la población el Roma se enfermó y hubo un gran índice de afectados en la Gran Bretaña hasta el año 1783.

Entre los años 1830 a 1833 se determinó una pandemia, que los autores hoy en día asocian su gravedad a la pandemia española de 1918. La pandemia comenzó en el invierno de 1830 en China, desde donde se extendió hacia el sur por mar para llegar a Filipinas, India e Indonesia, y atravesar Rusia hacia Europa; posteriormente se produjo una expansión a Norteamérica, teniendo en este lapso una infectividad de alrededor del 20 al 25% de la población.

Entre los años 1918 y 1920 se produjo una devastadora pandemia que generó una mortalidad en más del 25% de la población mundial y afectó a los 5 continentes. lo que la convierte en la pandemia más documentada de la historia. Su origen es desconocido, aunque hay autores que afirman que tuvo su origen en los Estados Unidos, más específicamente en el Estado de Carolina del Sur y en una prisión de San Quentin en 1918, por lo que se ha podido hacer seguimiento.

Se dice que la infección se diseminó a oriente cuando los jóvenes vinculados a las bases militares se disponían a sus entrenamientos para la fuerza naval expedicionaria y la guerra en Europa; y aunque había algunos casos afectados, permitieron que se embarca una tripulación en un barco con destino a depósitos militares en la ciudad de Burdeos en Francia en el mes de abril de 1918. Desde aquí, las infecciones se extendieron a la Fuerza Expedicionaria Británica (BEF) y otras fuerzas involucradas en la guerra en abril / mayo de 1918, y en los meses pasados llegaron a Italia y España ²².

Hubo brotes en Alemania y hacia el mes de mayo, hubo extensión a la Gran Bretaña principalmente a las fuerzas militares y a las fuerzas expedicionarias; lo que aquí condujo a que la principal fuerza expedicionaria británica fuera vector para la propagación de la infección en Rusia. La infección llegó al norte de África en mayo de 1918 y describió un círculo alrededor de África para afectar a Bombay y Calcuta y luego a China, Nueva Zelanda y Filipinas en junio de 1918 ²². Los grupos humanos más afectados fueron los adultos entre 20 y 40 años de edad. Muchos países experimentaron la segunda (1918- 1919) y la tercera oleada (1919- 1920) de la forma de infección más virulenta. Su gran potencial infeccioso se le atribuye a que en la época no existían vacunas para protegerse de la infección, así como tampoco se sintetizaban

antibióticos para tratar la coinfección bacteriana, lo que hacía que la infección por Influenza se incrementara y las complicaciones secundarias por coinfecciones fueran más frecuentes.⁷⁹

Finalizando los años 20, científicos lograron aislar virus de los cerdos siendo los principios de la investigación por Influenza; y fue luego, en el año 1933 que se logró identificar una cepa relacionada de un paciente humano. Después de largas investigaciones de la transmisibilidad de influenza entre cerdos, Richard E. Shope del Instituto Rockefeller de Patología Comparativa de Princeton, N.J., fue capaz de demostrar que el virus podía ser transmitido entre cerdos con material filtrado. Este aporte fue adoptado en Inglaterra, donde en el Instituto Nacional para la Investigación Médica en Londres, lograron inocular un aspirado traqueal de ser humano en nariz de hurones incentivando a la generación de neumonía. Esto sirvió para que años después siguieran las investigaciones acerca de la Influenza en hurones hasta el año 1940, que fue el año en el que se descubrió que el virus de la influenza puede desarrollarse en la membrana allantoica de huevos de pollo. Esto produjo que se descubriera la capacidad que tenía el virus de hacer conglomerados de glóbulos rojos (hemaglutinación). Este descubrimiento abrió paso al campo investigativo que promovió la creación de vacunas inactivadas para evaluar la capacidad inmunológica que debía generar.

En el año 1957, la humanidad volvió a estar alerta acerca la gran enfermedad contagiosa a expensas del virus de la influenza; teniendo como origen Yunan en China en el mes de febrero de 1957. Fue una infección altamente contagiosa que en pocos meses se diseminó hasta Hong Kong, pasando por Taiwan, Singapur y Japón. En este punto, la Organización mundial de la Salud (OMS) determinó la alta infectividad de este agente infeccioso y debido a las diseminaciones que tuvo en el continente asiático, se pudo dilucidar que este virus tenía un comportamiento estacional, ya que en el periodo en el que la enfermedad llegó a Japón se encontraba en invierno, lo cual iba a promover la pronta movilización del virus en estaciones invernales en todo el mundo. Se calcula que afectó entre un 40 y 50% a las personas, de las cuales un 30% tuvieron índice de morbilidad; teniendo como grupos etarios principales los jóvenes y los adultos mayores, teniendo una mortalidad compilada de 1 millón de personas

En el año 2009 emergió la enfermedad por virus de la Influenza, que se le denominó la ‘gripe porcina’; caracterizada por tener una sintomatología a nivel respiratorio, de fácil propagación y con pronta evolución a neumonía. Según los expertos afirman que el primer paciente fue proveniente de la ciudad de Oaxaca, quien ingresó en la primera semana del mes de abril; pero no fue hasta el mediados de mes que ingresaron dos niños a un hospital de California con sintomatología respiratoria como tos, rinorrea, cefalea y dolor torácico.²³ Se realizó la respectiva toma de muestra de estos pacientes , en lo que se evidencio que se trataba de un virus de Influenza A negativo de los subtipos conocidos H1N1, H3N2 y H5N1, por lo que se enviaron a los Centros para el Control de Enfermedades en Atlanta ²³, se determinó que este virus tiene 5 segmentos uno de tipo humano, dos de tipo aviar y dos de origen porcino, además de demostrarse que esta enfermedad tenía transmisión de humano a humano, siendo un factor de suma importancia para los medios de comunicación que se encargaron de propagar la información para promover las medidas de prevención entre comunidades.

2.3. BIOLOGÍA MOLECULAR DEL VIRUS DE LA INFLUENZA A (H1N1)

2.3.1. ENZIMA ARN POLIMERASA DEPENDIENTE DE ARN (RdRp)

En el virus de la Influenza A H1N1 existen tres proteínas que dan lugar a la generación del denominado ‘complejo polimerasa viral’, el cual tiene función de enzima polimerasa en el proceso de replicación y está involucrado en el proceso de replicación como en la transcripción de los ARNm. Los segmentos del genoma de ARN viral (ARNv) están unidos por una enzima ARN polimerasa heterotrimérica dependiente de ARN (RdRp), formando un complejo de ribonucleoproteína viral (vRNP). En el vRNP, los extremos 5' y 3' del ARNv están unidos a un heterotrímero polimerasa, mientras que el resto del ARNv se asocia con la nucleoproteína oligomérica (NP).²⁴ Esta enzima RdRp del virus de la influenza A H1N1, pertenece a la superfamilia de las polimerasas de ácido nucleico dependientes de plantilla, la cual se compone de tres subunidades que son PB1, PB2 y PA; que cumplen la función de enzimas polimerasas en

el proceso de replicación y así como también están involucradas en la transcripción de los ARNm.

El segmento uno del virus de la Influenza está compuesto por alrededor de 2320 nucleótidos y 759 aminoácidos, los cuales codifican la proteína básica 2 o PB2, la cual es la encargada de generar la iniciación de la transcripción al unirse a la región 5' cap del ARNm, más específicamente en los residuos Phe-363 y Phe-404 como sitios de interacción de esta proteína.²⁵ el extremo carboxilo contiene una señal de localización nuclear (NLS) bipartita para el importe nuclear del citoplasma (localizada en los residuos 678-757)²⁶

La proteína PB2 está compuesta de múltiples dominios. El tercio N-terminal de PB2 interactúa con PB1, haciendo contacto principalmente con el pulgar PB1 y la extensión C-terminal. Estos dominios tienen incluidos un dominio medio, un dominio que se une a la región cap, un enlazador cap 627, un dominio 627 (residuos 535-684)²⁷ y un dominio de la señal de localización nuclear (NLS) en C-terminal. La unión entre el enlazador y el dominio cap 627. En general, la polimerasa puede verse en la imagen 2, como un complejo formado por un núcleo de polimerasa que consiste en PB1, el dominio C-terminal de PA y la región N-terminal de PB2 y los apéndices periféricos flexibles que están formados por la endonucleasa PA / P3 y los dominios de unión a la tapa PB2, enlace medio, 627 y NLS²⁴

El segmento dos está compuesto por alrededor de 2341 nucleótidos y 757 aminoácidos, los cuales codifican la proteína básica 1 o PB1, encargada de la polimerización. Se caracteriza por tener una alta conservación de secuencias típicas de la enzima RNA polimerasa dependiente de RNA o RdRp. Esta proteína en sus extremos N-C terminal interacciona con el ARN, reconociendo el intermediario de la replicación en distintas regiones. Esta proteína tiene dos productos menores: una forma truncada en el extremo N-terminal de PB1 denominada PB1-N40, que se origina de la iniciación de la traducción en el codón 40 AUG5 / PB1 en el ARNm^{25,27} que interactúa con el complejo polimerasa y PB1-F2, un polipéptido corto que influye en la actividad y la localización intracelular de PB1 a través de una interacción que ocurre en los núcleos de las células.²⁸

La proteína PB1 está en el centro de la enzima polimerasa y tiene en su estructura los motivos para pre-A y A-E, los cuales son característicos de las enzimas polimerasas de ARN dependientes de ARN. PB1 tiene el pliegue canónico de cómo una mano derecha, que posee dedos, yemas, la palma y el pulgar, pero con extensiones adicionales en el extremo N y C que facilitan las interacciones con las subunidades PA / P3 y PB2, respectivamente ²⁴. Esta interacción es necesaria para la síntesis de ARNv y ARNvc. Esta subunidad está intercalada por el dominio endonucleasa N-terminal y el dominio C-terminal de la subunidad PA y PB2. Los estudios de cristalización con PA identificaron que los primeros 15 aminoácidos del término N de PB1 forman un bucle de interacción con PA, a través de varios enlaces de hidrógeno e hidrófobos. El mismo proceso se generó con PB2, arrojando que 86 aminoácidos del término C de PB1 se pliegan en un motivo hélice-bucle-hélice que interactúa estrechamente con el término N del PB2.²⁷

El segmento tres está compuesto por alrededor de 2211 nucleótidos y 716 aminoácidos, los cuales codifican la proteína ácida o PA, la cual tiene acción proteolítica encargada de la replicación. Hay estudios que han demostrado que la proteína PA está involucrada en el ensamblaje de un complejo de ARN polimerasa viral funcional y también en el ensamblaje y liberación de viriones de influenza.²⁹ Esta proteína también se caracteriza por tener señales de localización nuclear (NLS) en su región N-terminal, específicamente en los residuos 1-256, las cuales permiten dirigir el transporte de la proteína PB1 desde el citoplasma hasta el núcleo.²⁹

La proteína PA es productora de dos fragmentos de 25 y 55 kDa los cuales, están se conectan con un enlazador de 20 aminoácidos. El mayor de estos fragmentos contiene el término C del PA y está involucrado en la unión del término N del PB1 a través de los residuos 408–412, 617–623, 666–673 y 706–710. El menor de estos fragmentos pequeño contiene el dominio endonucleasa N-terminal. La estructura de este dominio es capaz de coordinar Mn 2+ o Mg 2+ a través de los residuos H41, E80, D108, E119 y K134.³⁰ Esta subunidad tiene además un residuo H510 que está inmerso en el secuestro de capuchones virales para contribuir a la unión de pre-ARNm.

2.3.2. HEMAGLUTININA

El segmento cuatro está compuesto por alrededor de 1757 nucleótidos y aproximadamente 566 aminoácidos, los cuales se encargan de codificar la proteína hemaglutinina (HA); denominada de esta manera por la capacidad que tiene para aglutinar los eritrocitos. La hemaglutinina tiene una conformación trimérica formada por una región fibrilar, tallo que une a dos regiones globulares, una grande y otra pequeña.³¹

Inicialmente se procesa siendo un polipéptido precursor enzimático de 70 kDa denominado como HA₀ que sufre un corte proteolítico por enzimas proteasas del hospedero para generar dos polipéptidos HA₁ y HA₂, que se unen por un enlace de puente disulfuro²⁶ entre la cisteína 14 de la cadena HA₁ y la cisteína 137 de HA₂.³¹ El corte del precursor es de gran importancia, ya que promueve la activación del potencial de fusión de membrana y por consiguiente la infectividad. Posterior a esto se forma una estructura en forma de trímero con un peso molecular de 220 kDa, con una cabeza globular constituida por hojas β-plegadas antiparalelas, en donde se encuentra el sitio de unión al receptor de ácido siálico. En la región carboxilo de HA₂ se genera el glóbulo pequeño que participa en el anclaje de la proteína a la bicapa lipídica del virus y en la región amino terminal de HA₁ se constituye el glóbulo grande, zona en la que están localizados los sitios de neutralización del virus.³¹

La hemaglutinina contiene un sitio de unión al receptor en la punta distal de la membrana, que tiene en su base una serie de aminoácidos conservados, Tyr-98, Trp-153, His-183 y Tyr-195 y en sus bordes, tres elementos conservados de estructura secundaria, los bucles 130 y 220 y la hélice 190-α.³² La unión con el ácido siálico se da por principalmente por los enlaces de hidrógeno que están presentes en los bucles 130 y 220 de la hemaglutinina. En el caso específico de la hemaglutinina H1, los enlaces de hidrógeno con los que se une al ácido siálico se forman entre Lys-222 y el 2-OH, 3-OH de Gal-2 y Asp-225 y 3-OH de Gal-2 y Asp-190 y GlcNAc-3. Hay una unión de enlaces en Gln-226, la cual se ubica un amperio más bajo del sitio del receptor aviar, lo que hace que el carbono 6 hidrofóbico del enlace glicosídico se dirija hasta el sitio. Esta posición más baja de Gln-226 en el complejo receptor humano y en HA H1 no ligado parece ser

una característica específica de hemaglutinina H1 como resultado de la conformación del bucle 130.³²

2.3.3. NUCLEOPROTEÍNA

El segmento cinco está compuesto por alrededor de 1540 nucleótidos y 498 aminoácidos, los cuales se encargan de codificar la nucleoproteína fosfoproteína NP, siendo esta la encargada de del transporte del complejo polimerasa viral al núcleo celular, principalmente interactuando con la proteína PB2 en el extremo COOH de la nucleoproteína, regulando la fuerza y estabilidad de este complejo NP-PB2⁷⁹ La nucleoproteína NP representa un factor de alargamiento que tiene un papel directo en la estimulación de la progresividad de la polimerasa³³

2.3.4. NEURAMINIDASA

El segmento seis está compuesto por alrededor de 1392 nucleótidos y aproximadamente 454 aminoácidos, que codifican la proteína neuraminidasa o NA. Esta proteína es la segunda proteína más común, después de la hemaglutinina que también es clasificada de acuerdo con su variedad, siendo 9 las neuraminidasas conocidas. Está formada por cabeza y tallo; en la cabeza se encuentran los cuatro sitios activos de la enzima; el tallo corresponde a la región amino terminal en donde se encuentran los residuos 73 y 74, en los que se da la interacción; la región entre los aminoácidos 36 al 73 forma el tallo y el resto la cabeza.

En el proceso de replicación, la neuroaminidasa rompe el ácido siálico en el enlace α -acetosídico³⁴, en una proteína de 469 aminoácidos de naturaleza transmembranal, con una pequeña cola citoplásmica en su extremo amino terminal (residuos 1-6), seguida de la región transmembranal (residuos 7-34) responsable de la translocación de la proteína.²⁶ Luego se encuentra una región no estructurada rica en aminoácidos polares (residuos 35-82) que conecta el ancla de la membrana al dominio catalítico de la neuroaminidasa (residuos 83-469)²⁶.

La neuraminidasa cataliza las uniones glicosídicas con el ácido siálico, acción que interviene en la liberación de viriones. Como resultado, se evita que los virus recién ensamblados se unan a la

superficie celular infectada y se agreguen entre sí a través de las interacciones de ácido siálico. En su lugar, se liberan de la célula para infectar nuevas células y propagar la infección³². Esta proteína tiene importantes residuos de aminoácidos los cuales pueden mutar y adquirir al virus resistencia contra los inhibidores de Neuraminidasa como el oseltamivir y zanamivir.⁸⁰

2.3.5. PROTEÍNAS M1 Y M2

El segmento siete es el encargado de codificar dos proteínas de membrana, las cuales son M1 y M2. Estas están compuestas por alrededor de 1005 y 315 nucleótidos y 252 y 96 aminoácidos, respectivamente. La proteína M1 es la más abundante; está ubicada bajo la cubierta lipídica del virus, recubriendo las ribonucleoproteínas virales. Esta proteína tiene una de sus superficies cargada positivamente, lo que hace que sea la parte responsable de la unión al ARN, mientras que su superficie opuesta es hidrofóbica y es la responsable de la interacción con membranas. Tiene una señal de localización nuclear y aparece en el núcleo a tiempos tempranos de la infección, donde establece interacciones con el RNA viral, con la NP y con la proteína NS2/NEP durante el ciclo infectivo. La proteína M2 es una proteína de membrana tetramérica, cada monómero unido por puentes disulfuro en la región N-terminal, lo que le confiere la característica de generar un canal iónico. Este canal se activa con un bajo pH exterior de 4,5 a 5-0, generando una permeabilidad selectiva de protones. Esto permite que este canal funcione como un antiportador que facilita el flujo de salida de los cationes (K^+ y Na^+) junto con el influjo de protones. La actividad selectiva del canal iónico depende del canal iónico formado por las cuatro hélices alfa, cuyos residuos con carga polar y única están orientados hacia el canal y los residuos hidrófobos se dirigen hacia la bicapa lipídica.³⁵ Este canal permite el paso de protones del endosoma hacia el interior del virión; el cambio de fuerza iónica participa en la separación del complejo ribonucleoproteína (RNP) y de M1.³¹

2.3.6. PROTEÍNAS NS1 Y NS2

El segmento ocho es el encargado de codificar dos proteínas no estructurales, NS1 y NS2. Estas están compuestas por alrededor de 868 y 395 nucleótidos y aproximadamente 230 y 121 aminoácidos respectivamente. La proteína NS1 tiene función principalmente en el empalme, transporte y la traducción del ARN. Puede bloquear la activación de la proteína quinasa (PKR) activada por el ARN de doble cadena, lo que genera una regulación a la baja de la traducción y es parte del mecanismo de defensa antiviral celular.^{ns1} La proteína NS2 interviene en la exportación nuclear del ARN viral actuando como un adaptador entre los complejos de ribonucleoproteínas virales y la maquinaria de exportación nuclear de la célula³⁶

2.4. REPLICACIÓN DEL VIRUS

En primera instancia la hemaglutinina tiene una estructura trimérica que forma tres picos proteicos, que en la membrana del virus está en mayor proporción que la neuroaminidasa. La hemaglutinina se une a receptores celulares que contengan residuos de ácido siálico terminales del tipo α -2,6 para el caso de las células epiteliales pulmonares humanas, α -2,3, que se encuentran en células bronquiales de aves y otros casos como el de los cerdos donde las células de epitelio pulmonar tienen residuos que coexisten como el α -2,3 y α -2,6³⁷. La hemaglutinina para su síntesis tiene su precursor HA0 formado por dos subunidades, una de ellas denominada HA1 que posee el dominio de unión al receptor y HA2 que posee el péptido de fusión. En el caso del ser humano, la unión al ácido siálico va a depender del apareamiento que se genere a una molécula de galactosa por medio de un enlace tipo alfa (α) dado entre el carbono 2 del ácido siálico y el carbono 6 de la molécula de galactosa. En el caso de las aves, este enlace se da entre el carbono 3 de la molécula de galactosa.

Posterior a esta unión, el virus ingresa a la célula por endocitosis para liberar el material genético. La hemaglutinina se rompe por acción de proteasas intracelulares que permiten la

fusión de la envoltura viral con la envoltura del endosoma celular, lo que genera la acidificación de la vesícula endocítica³⁷. Este proceso debe realizarse con un pH entre 5,0 y 6,0 para que de esta manera se produzcan cambios en HA0, manteniendo el dominio HA1 y dejando expuesto el péptido de fusión HA2 para que sea el punto en el que la membrana del endosoma formado y la membrana viral se conecten. Este pH también permite la apertura de un canal de iones mediado por la proteína transmembrana M2, lo que promueve que el núcleo del virus se acidifique, haciendo que la ribonucleoproteína viral (vRNP) presente en la proteína M1 entre al citoplasma de la célula a infectar. Estas vRNP son respectivamente NP, PB1, PB2 y PA caracterizadas por tener señales de localización nuclear (NLS), que les permiten unirse a la maquinaria celular para poder llegar al núcleo.

Para el proceso de replicación del virus, existe una ARN polimerasa dependiente de ARN viral (RdRp) que ayuda a convertir la cadena negativa del ARN inicial a una cadena de carga positiva, ya que se une a la región ‘mango de sartén’ o pandhandle, que funciona como el promotor de la transcripción y el origen de replicación del genoma³⁸. Esta RdRp está conformada por tres proteínas virales que son PB1, PB2 y PA. PB2 tiene actividad endonucleasa. Se une a las tapas metiladas en 5' de los ARNm celulares y escinde los ARNm celulares de 10 a 15 nucleótidos 3' a la estructura cap.³⁹ Esta enzima se une a la ARN polimerasa II (Pol II) de la célula mediante la fosforilación del dominio de repetición C-terminal (CTD) en la serina 5, para acceder al ARN del huésped con extremo naciente para el secuestro de capuchones.

Las subunidades PB2 y PA están involucradas en el proceso de captura de capuchones que consiste en la unión de PB2 al 5' cap de transcripciones nacientes, mientras que PA escinde los nucleótidos pre-mRNA del anfitrión 10-13 por el flujo de la estructura del cap. La forma de capuchón se distribuye por formación de una forma “U” por parte de la RdRp, junto con PB1 que forma la parte central y la región de unión a la tapa de PB2 y la región que contiene endonucleasa de PA que forma las porciones superiores. Las subunidades PB2 y PA pueden sufrir reordenamientos cuando se unen al promotor ARNv⁴⁰ de esta manera se puede iniciar el proceso de transcripción, que se realizará en el núcleo de la célula infectada²⁴

El proceso de transcripción tiene inicio con la adición de un guanosin trifosfato (GTP) al extremo 3' del cebador secuestrado que está templado por el segundo residuo en la plantilla del ARNv. Durante la elongación, esta unión se separa y salen a través de sus respectivos canales de salida. A medida que la plantilla se introduce en el sitio activo, la NP se separa del ARNv entrante, se transloca a través de la superficie de la polimerasa y se une a la plantilla de ARNv a medida que emerge a través del canal de salida de la plantilla. El cap 5 'se libera del dominio de unión a cap PB2 cuando la polimerasa entra en el alargamiento.⁴¹

El virus utiliza la maquinaria de empalme de la célula huésped para poder expresar las proteínas M1, M2, NS1 y NEP y poder así ejecutar el proceso de replicación. NS1 se une a pequeños ARN nucleares (snRNAs), específicamente a regiones no codificantes conservadas U6 y otros componentes de empalme, lo que hace que vuelvan a localizar al núcleo de las células infectadas. De esta forma, el virus de la Influenza puede inhibir el empalme de los ARNm celulares.³⁹ Luego de esto se podrá iniciar la replicación de cada segmento por medio de los ARNm con ayuda del complejo de polimerasas virales PB1, PB2 y PA, que serán luego empaquetadas en el citosol gracias a la ayuda de las proteínas M1, proteínas no estructurales (NEP)¹⁹, la proteína hemaglutinina, junto con los otros componentes del virus llegan a la membrana celular. Gracias a la ayuda de la NA que es formada en el retículo endoplasmático para luego llegar a la membrana junto a los otros segmentos virales, con la finalidad de hacer ruptura del ácido siálico de la célula huésped para evitar la interacción con la HA y así liberar el virión para que este siga infectando.

2.5. ASPECTOS CLÍNICOS

El virus de la Influenza A, se transmite persona a persona por medio de gotas de saliva generadas por estornudos, tos o por contacto directo con mucosas infectadas por el virus, también la transmisión de la influenza por contacto indirecto puede ocurrir cuando las partículas infecciosas se depositan en las superficies táctiles, que actúan como un vector para la transferencia de la infección⁴², En general el cuadro clínico de la Influenza A H1N1 no es diferente a una enfermedad infecciosa respiratoria con un periodo de incubación de 2 a 7 días⁴³, observando

síntomas comunes como tos, cefalea, astenia, rinorrea, rinitis, faringitis y expectoración, además de otros síntomas gastrointestinales poco comunes como vómito, diarrea y náuseas ⁴⁴

Los adultos entre 19 a 40 años pueden contraer la enfermedad, con un cuadro clínico que puede durar entre 3 a 7 días con síntomas que incluyen fiebre, rinorrea y tos, esta última con una posible persistencia de dos semanas, para luego dar resolución a la enfermedad. Existe población que es más vulnerable a adquirir la enfermedad y tener posibles complicaciones, como la población infantil, adultos mayores, personas con condiciones asociadas como la inmunodeficiencia, la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), la enfermedad respiratoria aguda (ERA) y las mujeres embarazadas ya que en el proceso embrionario ocurren cambios inmunológicos lo que hace susceptible a la gestante a contraer la enfermedad; pero estos casos son de impacto ya que los la mayoría pueden ser letales. En los niños los cuadros clínicos respiratorios agudos con sospecha de influenza A H1N1, incluyen síntomas básicos como fiebre elevada, tos, coriza, odinofagia, dificultad respiratoria, rechazo del alimento, vómitos y diarrea, además decaimiento, somnolencia, cefaleas y mialgias.⁴⁵ Dentro de las complicaciones que puede traer una infección con el virus de influenza A H1N1 en todo tipo de pacientes, se encuentra la neumonía primaria por Influenza, neumonía bacteriana secundaria, neumonía debida a patógenos inusuales o en huéspedes inmunocomprometidos, neumonía grave por influenza AH1N1, complicaciones neurológicas, síndrome de choque tóxico y exacerbaciones de enfermedades pulmonares crónicas ⁴⁷

La neumonía primaria por influenza, ocurre generalmente en pacientes mayores a 45 años, asociándose a enfermedades cardíacas y pulmonares, con una mortalidad de 6% de los casos que ingresan a los hospitales y se presenta con síntomas como disnea extrema, fiebre, tos, incluyen bronquitis necrotizante, membranas hialinas, edema, e inflamación intersticial. La neumonía debida a patógenos se caracteriza por la resolución de los síntomas iniciales que tiene el paciente, pero en 28 días después tiene neumonía asociada a bacterias de estas los patógenos más comunes son *Streptococcus pneumoniae*, y *Haemophilus influenzae*⁴⁷, *Streptococcus pyogenes*, y *Staphylococcus aureus*¹⁰ Debe sospecharse cuando los síntomas de Influenza han resuelto y reinicia la fiebre 4 a 14 días después, asociado a disnea, tos productiva y consolidación en la radiografía de tórax. En pacientes con inmunosupresión los síntomas son de aparición más

rápida; en pacientes que no tiene enfermedades asociadas inicialmente, pueden desencadenar enfermedades respiratorias obstructivas crónicas a causa de la enfermedad por influenza A. La neumonía grave por Influenza se caracteriza por cambios histopatológicos en el pulmón. Se caracterizan por cuadros bronquiolitis extensas, alveolitis, edema y hemorragia, focal. Los neumocitos tipo II son el objetivo principal del virus de la Influenza y las células epiteliales con antígeno positivo se encuentran próximas a los sitios dañados.⁴⁹

Las posibles complicaciones neurológicas por virus de la Influenza A H1N1 se desarrollan principalmente en población vulnerable, generalmente mostrando cuadros clínicos de encefalitis, encefalopatía aguda necrotizante y meningitis aséptica; en adultos se presenta hiponatremia refractaria, somnolencia y alteraciones de la memoria. Esto es producto a la gran cantidad de productos pro inflamatorios y citocinas generadas a nivel sistémica por la infección, aumentando la permeabilidad de la barrera hematoencefálica.⁴⁸

Otras complicaciones por infección respiratoria por virus de influenza en niños pueden ser la otitis media, traqueobronquitis y complicaciones secundarias como laringotraqueitis, manifestaciones cardiovasculares, musculares, renales, endocrinas, gastrointestinales, hemáticas y a nivel del sistema nervioso central, en forma de cuadros convulsivos, encefalitis y encefalopatía y síndrome de Guillain-Barré bronquiolitise⁵⁰. Los otros grupos de pacientes también presenta complicaciones parecidas, subyacentes a condiciones médicas previas, como lo son la complicación de afecciones cardíacas, pulmonares y renales, incluyendo infecciones secundarias a la enfermedad que pueden provocar, sinusitis y otitis.^{50,47}

2.6. DIAGNÓSTICO

Para un adecuado diagnóstico de la enfermedad por virus de la Influenza, se debe realizar una completa anamnesis del paciente, donde se logre establecer una sintomatología característica por virus de la Influenza. De la misma manera es de suma importancia un diagnóstico diferencial entre otros agentes que afectan el tracto respiratorio con síntomas similares como por ejemplo la enfermedad por virus sincitial respiratorio, Adenovirus, Rhinovirus, Coronavirus,

Metapneumovirus, entre otros estacionales ^{51,52}. Las pruebas diagnósticas son una herramienta que permite diferenciar y direccionar el manejo médico de la Influenza, como por ejemplo con los medicamentos a utilizar o pruebas adicionales que practicar. Entre estas últimas se encuentran pruebas de detección de antígenos, pruebas especializadas como los ensayos moleculares o pruebas de inmunofluorescencia ⁵³. A nivel de seguimiento salud pública se utiliza el cultivo celular.

- **PRUEBAS RÁPIDAS:** Son pruebas de detección de antígenos del virus de la Influenza, las cuales ofrecen un resultado en un lapso de 10 a 15 minutos con una sensibilidad y especificidad entre el 50 al 90%. Es recomendable hacer pruebas confirmatorias con pruebas moleculares. Estas pruebas usan anticuerpos monoclonales que se dirigen a la nucleoproteína viral y emplean inmunoensayo enzimático o técnicas inmunocromatográficas (flujo lateral) ⁵². Las muestras empleadas para estas pruebas son las provenientes de las vías respiratorias altas como los hisopados y lavados nasofaríngeos, nasales o faríngeos.
 - **PRUEBAS MOLECULARES:** Aquí se incluyen pruebas moleculares rápidas, las cuales sirven para la detección de ácidos nucleicos con una alta sensibilidad y especificidad entre el 90 y 95%; estas proporcionan resultados en un lapso de 15 a 30 minutos. Adicionalmente se puede hacer una prueba de reacción en cadena de la polimerasa con retrotranscriptasa (RT-PCR) que ofrece una alta especificidad y sensibilidad, en la que puede hacer la detección del tipo específico de virus de la Influenza (A o B) así como subtipos. Este ensayo consta de tres pasos esenciales: (1) extracción de ARN viral de muestras clínicas; (2) Transcripción inversa de ARN vírico a un ADNc monocatenario usando la enzima transcriptasa inversa; y (3) la amplificación de los genes blanco, que incluyen la proteína de matriz M2 y la hemaglutinina, que para la OMS se utilizan los siguientes cebadores
- | | |
|-----------------------------|--|
| Matriz(M) | M30F2/08 |
| ATGAGYCTTYTAACCGAGGTCGAAACG | Matriz(M) M264R3/08 |
| TGGACAAANCGTCTACGCTGCAG, | esperando unproducto de 244bp ^{54,55} |
- PCR está acoplada a la detección fluorescente de productos de PCR marcados.⁵⁶ Las muestras

empleadas en estas pruebas son las provenientes de las vías respiratorias altas como los hisopados nasofaríngeos y nasales.

- **INMUNOFLUORESCENCIA:** Es un tipo de ensayo en el que se detecta un antígeno viral de Influenza (A o B) por medio de la generación de un complejo con anticuerpos, el cual crea una reacción fluorescente vista con un microscopio especial. Estas pruebas pueden ser de tipo directo (IFD) o de tipo indirecto (IFI). Este ensayo implica la tinción directa de las células epiteliales respiratorias derivadas de torundas nasofaríngeas o aspirados nasofaríngeos con anticuerpos específicos del virus de la gripe marcados con fluorescencia seguido de un examen con un microscopio de fluorescencia.⁵⁶
- **ENSAYOS DE INHIBICIÓN DE LA HEMAGLUTINACIÓN (HAI):** Este ensayo busca la presencia de anticuerpos específicos del virus de la Influenza en el suero del paciente a evaluar posterior a una vacuna o posterior a una infección. Este ensayo se basa en la capacidad de los anticuerpos específicos de HA para prevenir la unión del virus de la Influenza a los eritrocitos obtenidos de pollo, pavo, humano, caballo o cobayas. La mayor dilución de suero que previene la hemaglutinación completa se denomina título de HAI del suero.⁵⁶ Gracias a este título se puede realizar una cuantificación de anticuerpos que permite determinar la relación antigénica de la cepa correspondiente del virus de la influenza. Actualmente, la demostración de títulos HAI postvacunales, que cumplen ciertos criterios en proporciones fijas de receptores de vacunas, se utiliza en Europa como base para la aprobación de la vacuna anual actualizada y en gran parte para la autorización de nuevas vacunas basadas en hemaglutinina.⁵⁷
- **ENSAYOS DE NEUTRALIZACIÓN DEL VIRUS (VN):** Este ensayo al igual que el ensayo de hemaglutinación, busca la presencia de anticuerpos séricos específicos contra el virus de la Influenza. Este enfoque se basa en la capacidad de los anticuerpos específicos de virus para neutralizar el virus, evitando así la infección viral de las células. El recíproco de la dilución de suero más alta a la cual la infección del virus está completamente bloqueada se considera el título de neutralización del virus.²⁸
- **CULTIVO:** El diagnóstico definitivo se logra mediante el aislamiento del virus en cultivo celular^{52,56}. Este también es utilizado para la caracterización antigénica y genética del virus de la Influenza. No obstante, no es un método que permita generar seguimiento

oportuno a nivel clínico, debido a que sus resultados son proporcionados entre 7 y 10 días. El aislamiento del virus de la influenza generalmente se realiza en líneas celulares establecidas, como las células de riñón canino Madin Darby (MDCK), A549, línea de células epiteliales de pulmón de visón (Mv1Lu), células de riñón de mono rhesus (LLC MK2) y células de riñón de mono verde de búfalo (BGMK), líneas celulares primarias, tales como riñón de mono rhesus (RhMK) o riñón de mono verde africano (AGMK)^{52,56}. El cultivo puede tratarse o no con tripsina, ya que esta ayuda a la internalización del virus en algunas células como las MDCK. Para evaluar resultados luego del tiempo de incubación, se puede observar el efecto citopático que causan el virus de la Influenza A, teniendo característica como la formación de una vacuolización focal aumentada de las células, el deterioro celular, seguido de una condición de CPE avanzada por el desprendimiento de las células del sustrato.⁸¹

2.7. RESPUESTA INMUNE

La infección de las células del tracto respiratorio origina la activación de la respuesta inmune innata o inespecífica y a medida que la infección progresa, se produce el despliegue de la respuesta inmunitaria adaptativa o específica si la primera fase no logró controlar la infección.⁵⁸ La respuesta inmune innata en la influenza se da por la liberación de interleuquinas y quimioquinas, las cuales generan una movilización de células defensoras al punto de la infección. Estas células son los monocitos, macrófagos, células dendríticas y células natural killer.

Los macrófagos son células encontradas en los tejidos del cuerpo la cuales pueden reconocer y destruir patógenos. Además, tienen la capacidad de producir proteínas con efectos focales (enzimas activadores de plasminógeno, factores activadores de plaquetas, ácido nítrico, etc), citoquinas inflamatorias y quimioattractantes que promueven el reclutamiento celular de neutrófilos y monocitos que conduce al comienzo y mantenimiento de la inflamación. Las células dendríticas son las principales células presentadoras de antígenos (CPA) y las encargadas

de promover la activación de células T por la expresión de moléculas co estimuladoras y la producción de citoquinas. Son las células que reconocen el virus y se dirigen a nódulos linfáticos para generar la presentación antigénica.

Las células natural killer (NK) son las células capaces de reconocer y destruir células infectadas con el virus. Esta respuesta puede darse debido a la presencia de receptores membranales como lo son los receptores tipo toll (TLR) los cuales son TLR3, TLR7, TLR8, RIG-1 Y NALP-3.⁵⁹ Estos reconocen la partícula viral y promueve la estimulación de mediadores y citoquinas IFN alfa y beta; estos últimos inducen la proliferación de células T de memoria, evitan la apoptosis de células T, generan una mayor secreción de IFN gamma y la diferenciación de las células B a células plasmáticas y activación de las células NK.

La respuesta inmune adaptativa es específica frente a un determinado antígeno y crea memoria. La acción coordinada de las células T4 o helper, T8 citotóxicas y B efectoras (plasmáticas) serán las encargadas de eliminar la infección y de proteger contra la reinfección.⁶⁰ Los macrófagos y las células dendríticas se dirigen a los nódulos linfáticos para la presentación antigénica a los linfocitos T; posteriormente se producirá la diferenciación a células Th, Th1, Th2 y Th17, encargados de la respuesta celular y humoral. En lo que concierne a la respuesta humoral, los anticuerpos producidos en esta serán útiles en un reinfección o infección secundaria, pues en esta ocasión ya habían anticuerpos anti-H, que impiden la entrada del virus a la célula diana y anticuerpos anti-N que limitaran la liberación de partículas virales.

La interacción del patógeno con la célula presentadora de antígeno- influyen en el balance de citoquinas inicial de la respuesta inmune innata, determinando el desarrollo de Th1 y Th2 y desplazando la respuesta inmune hacia una respuesta humoral o hacia una respuesta celular mediada por fagocitos y linfocitos T citotóxicos⁵⁹. Las células diferenciadas en Th1 son promotoras de IL-2 e IFN gamma y sirven para la proliferación de células T CD8+ citotóxicas, que una vez activadas se dirigen a la localización de la infección, reconocen células presentadoras de antígeno cuyo péptido se asocia a MHC-I en su superficie y posteriormente se eliminan mediante la liberación de granzima B y perforina. Las células diferenciadas en Th2 son precedidas por células T CD4+ gracias a un ambiente rico en IL-4. Promueven la activación de

las células B para su evolución a célula plasmática productora de inmunoglobulinas, unas de baja afinidad (IgM) y otras que serán liberadas durante la respuesta inmune secundaria (IgG, IgA e IgE).

En esta respuesta adaptativa, existe también una subpoblación diferenciada a partir de la proliferación de linfocitos T efectoras y linfocitos T vírgenes que actuaron en la respuesta primaria. Se encuentran en un estado de reposo precedido por la declinación de una población de células hermanas T efectoras. Estas células estarán listas para responder rápida e intensamente a una respuesta secundaria, pues no tienen muchos requerimientos de activación. Por último, en esta respuesta también se encuentran células T reguladoras (T reg) diferenciadas en CD4+ CD25+, que se encargan de modular la respuesta inmune como mecanismo de prevención de daño tisular.⁶¹ Ellas pueden inhibir y controlar fases inmunopatológicas regulando la proliferación de células CD4+ y CD8+.

2.8. VACUNAS

Para el año 2018, el centro de control de enfermedades- CDC ha determinado las vacunas contra la Influenza en Estados Unidos para la temporada de influenza de la siguiente manera:⁶²

- Vacunas inactivadas contra la influenza, tetravalente (IIV4), dosis estándar: disponibles con el nombre comercial Afluria tetravalente, Fluarix Quadrivalent, FluLaval Quadrivalent y Fluzone Quadrivalent, las cuales contiene 15 μ g de antígeno H de cada vacuna por dosis de 0,5 mL. La primera de estas es recomendada en individuos mayores de 5 años de edad.⁶² El resto de vacunas son recomendadas en individuos de más de 6 meses de edad, siendo su vía de entrada a nivel intramuscular.
- Vacuna inactivada contra la influenza, tetravalente (ccIIV4), dosis estándar, a base de cultivo de células: disponible con el nombre comercial Flucelvax Quadrivalent, la cual contiene 15 μ g de antígeno H en la vacuna por dosis de 0,5 mL.⁶² Es recomendada para individuos mayores de 4 años de edad, siendo su vía de entrada a nivel intramuscular.

- Vacuna inactivada contra la influenza, tetravalente (IIV4), dosis estándar, intradérmica: disponible con el nombre comercial Fluzone Intradermal Quadrivalent, la cual contiene 9 μg de antígeno H de cada vacuna por dosis de 0,1 mL.⁶² Es recomendada para individuos entre 18 a 64 años de edad, siendo su vía de entrada a nivel intramuscular
- Vacunas inactivadas contra la influenza, trivalente (IIV3), dosis estándar: disponibles con el nombre comercial Afluria y Fluvirin, las cuales contiene 15 μg de antígeno H de cada vacuna por dosis de 0,5 mL.⁶² La primera de estas es recomendada en individuos mayores de 5 años de edad. La segunda es recomendada en individuos mayores de 4 años de edad, siendo su vía de entrada a nivel intramuscular
- Vacuna inactivada contra la influenza con coadyuvante, trivalente (aIIV3), dosis estándar: disponible con el nombre comercial Fluad, la cual contiene 15 μg de antígeno H de cada vacuna por dosis de 0,5 mL.⁶² Es recomendada en individuos mayores a 65 años, siendo su vía de entrada a nivel intramuscular
- Vacuna inactivada contra influenza, trivalente (IIV3), dosis alta: disponible con el nombre comercial Fluzone de dosis alta, la cual contiene 60 μg de antígeno de cada vacuna por dosis de 0,5 mL. Es recomendada para individuos mayores de 65 años de edad, siendo su vía de entrada a nivel intramuscular
- Vacuna recombinada contra la influenza, tetravalente (RIV4): disponible con el nombre comercial Flublok Quadrivalent, la cual contiene 45 μg de antígeno HE de cada vacuna por dosis de 0,5 mL.⁶² Es recomendada para individuos mayores de 18 años de edad, siendo su vía de entrada a nivel intramuscular
- Vacuna recombinada contra la influenza, trivalente (RIV3): disponible con el nombre comercial Flublok, la cual contiene 45 μg de antígeno HE de cada vacuna por dosis de 0,5 mL. Es recomendada para individuos mayores de 18 años de edad, siendo su vía de entrada a nivel intramuscular

2.9. ANTIVIRALES

Un antiviral es una sustancia química que es capaz de inhibir o interrumpir la replicación del virus además de poder intervenir con sus proteínas estructurales. Dentro de las clases de antivirales, se encuentran los inhibidores M2, los inhibidores de neuraminidasa y los inhibidores de la polimerasa ⁶³. El CDC recomendó los siguientes antivirales para el tratamiento de la Influenza en el año 2018:

- Oseltamivir: disponible con el nombre comercial Tamiflu en presentación oral. Se puede utilizar como tratamiento sin límite de edad o como quimioprofilaxis en individuos mayores de 3 meses de edad. Actúa para Influenza tipo A y B, inhibiendo selectivamente la neuraminidasa e interfiriendo en las etapas de agregación y liberación de las partículas virales de las células infectadas ⁶⁴. El carboxilato de oseltamivir, es el éster etílico que presentan evidente analogía estructural con el ácido siálico y a ello se atribuye su capacidad de sustituir al sustrato natural en el sitio activo de la neuraminidasa. ⁶⁵
- Zanamivir: disponible con el nombre comercial Relenza en presentación de inhalador. Se puede utilizar como tratamiento para individuos mayores de 7 años o como quimioprofilaxis en individuos mayores de 5 años. Actúa para Influenza tipo A y B, siendo un análogo del ácido siálico. Su eficacia ha sido ampliamente cuestionada, especialmente en los pacientes con neumonías gripales graves ingresados ⁶⁶
- Peramivir: disponible con el nombre comercial Rapivab en presentación inyectable intravenoso. Se puede utilizar como tratamiento en individuos mayores de 2 años o como quimioprofilaxis sin límite de edad. Su mecanismo de acción se fundamenta en la inhibición de la neuraminidasa a través de un análogo del sitio de unión a esta.
- Amantadina y Rimantidina: actúan en la inhibición de la descapsidación vírica al neutralizar el canal iónico de M2 en la acidificación del interior de la partícula vírica, pero no son recomendados debido a resistencia que ha presentado el virus ^{66,67}
- Favipiravir: conocido como favipiravir T-705; (6-fluoro-3-hidroxy-2-pirazinacarboxamida) y los compuestos relacionados T-1105 y T-1106⁶⁶ favipiravir es un derivado de pirazinacarboxamida por lo que es un miembro de pirazinas y una

carboxamida primaria. Los estudios experimentales indican que este fármaco actúa en las primeras fases de la replicación viral, inhibiendo la ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRp).⁶⁶ El mecanismo de acción del favipiravir es la inhibición directa de la replicación y transcripción del genoma viral tipo ARN, a través del bloqueo de la actividad de la RdRp.⁶⁸ También se conoce que el favipiravir se convierte en el derivado de ribofuranosiltrifosfato por las enzimas del huésped e inhibe selectivamente la ARN polimerasa dependiente de ARN viral.⁸

2.10. ACOPLAMIENTO O DOCKING MOLECULAR

La bioinformática es una disciplina que permite la intersección entre las ciencias de la vida y de la información,⁹⁶ que proporciona herramientas y recursos para favorecer la investigación biomédica. Una de estas herramientas es la bioinformática estructural la cual permite el análisis, la caracterización y la visualización de estructuras proteicas y químicas además de poder identificar y estudiar de sus interacciones mediante técnicas computacionales.⁹⁶

El objetivo de la bioinformática estructural es establecer interacciones entre estructuras receptoras y moléculas diana, que sean blanco para brindar soluciones alternativas a tratamientos para enfermedades, principalmente aquellas que sean ocasionadas por agentes patógenos. La bioinformática estructural permite una búsqueda virtual de moléculas capaces de unirse a la estructura receptora o proteína blanco, esperando que esta unión tenga un efecto de inhibición o bloqueo, lo que guiará a la generación de alternativas terapéuticas con la invención de nuevos fármacos. Dentro de los métodos más utilizados para encontrar una interacción óptima con capacidad de inhibición, se encuentra el docking.⁹⁷, en el que se utilizan algoritmos que funcionan en una matriz tridimensional dependiente de los puntos 'x', 'y' y 'z'. Esta tiene unidades medida dadas en Å (Amstrongs), dentro de la cual se realiza una búsqueda rápida de conformaciones que son evaluadas mediante la función 'scoring function' que les asigna un puntaje relacionado directamente con su afinidad. Esta es definida como la fuerza de la interacción entre dos moléculas que se unen de forma reversible, representada en la energía libre de Gibbs de un ligando con un receptor, que se representa proporcionalmente en números

negativos y en las unidades kilocalorias/mol (kcal/mol). La afinidad es importante en el estudio de nuevos fármacos, ya que de esta depende la capacidad del ligando para producir una respuesta biológica a la unión al receptor y la magnitud cuantitativa de esta respuesta.⁹⁶

Adicionalmente, el docking permite la comprensión de la energía de interacción electrostática, enlaces de tipo convencional como los enlaces covalentes y enlaces con otros tipos de energía como la de Van der Waals. Para ejecutar el docking se utilizan programas como Autodock Tools, Autodock Vina, HADDOCK y FlexX, además de programas para la visualización de las interacciones resultantes como UniproUgene y PYMOL.⁹⁷

3. DISEÑO METODOLÓGICO

3.1. UNIVERSO, POBLACIÓN Y MUESTRA

- UNIVERSO: Virus de la Influenza A (H1N1)
- POBLACIÓN: Proteínas del virus de la Influenza A (H1N1)
- MUESTRA: Proteínas PB1, PB2 y PA del virus de la Influenza A (H1N1)

3.2. HIPÓTESIS Y VARIABLES

3.2.1. HIPÓTESIS

La enzima RdRp del virus de la influenza AH1N1 en sus proteínas PB1, PB2 y PA, tiene regiones de aminoácidos altamente conservados. Por lo cual se podría generar un acoplamiento molecular con compuestos químicos que actúen sobre estos, principalmente aquellos análogos del fármaco favipiravir, que es usado en el tratamiento de la Influenza, así como derivados de compuestos de este mismo fármaco. Para que de esta manera se genere una propuesta alternativa para el tratamiento de la Influenza.

3.2.2. VARIABLES

Tabla 2. Variables dependientes e independientes de la investigación.

VARIABLES DEPENDIENTES	VARIABLES INDEPENDIENTES
Porcentaje de similitud	Conservación de las secuencias
Afinidad	Sitios de unión

Se determinan estas variables para analizar los resultados de la secuenciación bioinformática de aminoácidos y el docking molecular.

3.3. TÉCNICAS Y PROCEDIMIENTOS

3.3.1. TÉCNICAS

ALINEAMIENTO MÚLTIPLE DE SECUENCIAS

El alineamiento consiste en situar las secuencias de forma ordenada, con el fin de determinar las relaciones o diferencias entre ellas ya sea en la identificación de residuos conservados o mutados⁶⁹. Con las secuencias obtenidas en la base de datos del NCBI de las proteínas PB1, PB2 y PA del virus de la Influenza A H1N1 se realizó el proceso de alineamiento por medio del programa Muscle, en el que se compararon las secuencias mediante la búsqueda de patrones de caracteres comunes y el establecimiento de los residuos de correspondencia entre las secuencias relacionadas⁸³

DOCKING MOLECULAR

Se utiliza el programa ‘Autodock Vina’ en el que se determina el acoplamiento molecular y su detección virtual por medio de procesos computacionales.⁷⁰ que predicen con una serie de búsquedas o ejecuciones independientes, la unión no covalente de macromoléculas (receptores) y una molécula pequeña (ligando) de manera eficiente, con el fin de obtener indicios para nuevos medicamentos; seleccionando entidades químicas que se unen fuertemente a los sitios activos de los objetivos biológicamente importantes^{70,71}

SELECCIÓN DEL LIGANDO

Con ayuda de la base de datos de fármacos y sustancias activas 'PubChem', se realizó la búsqueda de compuestos cuyo estructura sea derivado de pirazinacorbazamida. Además se tomaron las moléculas más similares que sugiere esta base, con una configuración similar a pirazinacorbazamida, con la finalidad del acoplamiento con la enzima RdRp.

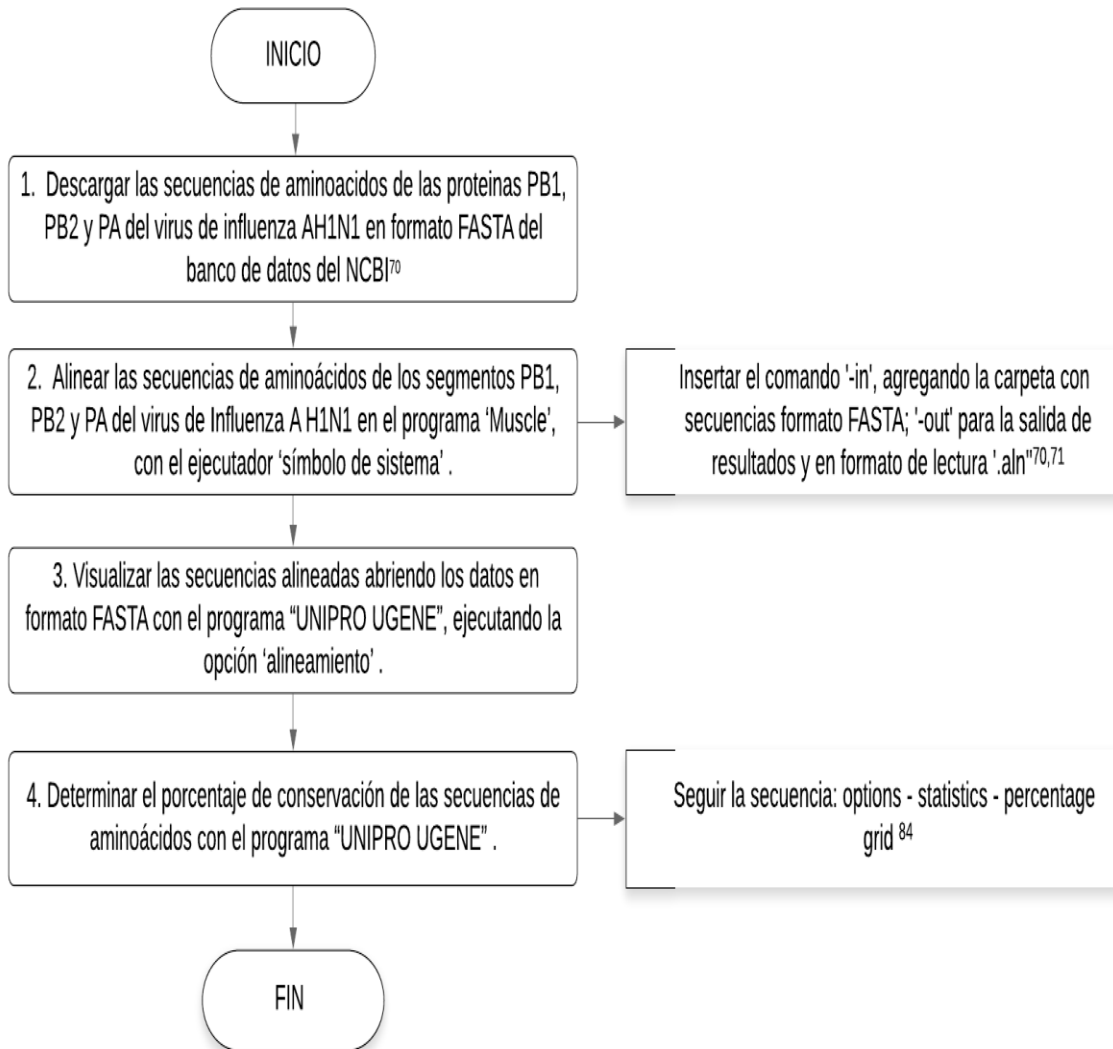
SELECCIÓN DEL RECEPTOR

Se tiene en cuenta que las moléculas receptores sean las proteínas PB1, PB2 y PA que conforman la enzima RdRp del virus de la Influenza A (H1N1). Se utiliza la base de datos RCSB PDB- Protein Data Bank, la cual que recolecta y almacena datos y resultados de estudios investigativos en donde se obtienen proteínas con estructura tridimensional de una macromolécula, que está estrechamente relacionada con su función y con el diseño de medicamentos basados en la estructura. A su vez, la estructura proteica determina con cuál molécula puede interactuar, ya que la forma de la molécula debe complementar la forma del sitio correspondiente en la proteína.^{85,84}

3.3.2. PROCEDIMIENTOS

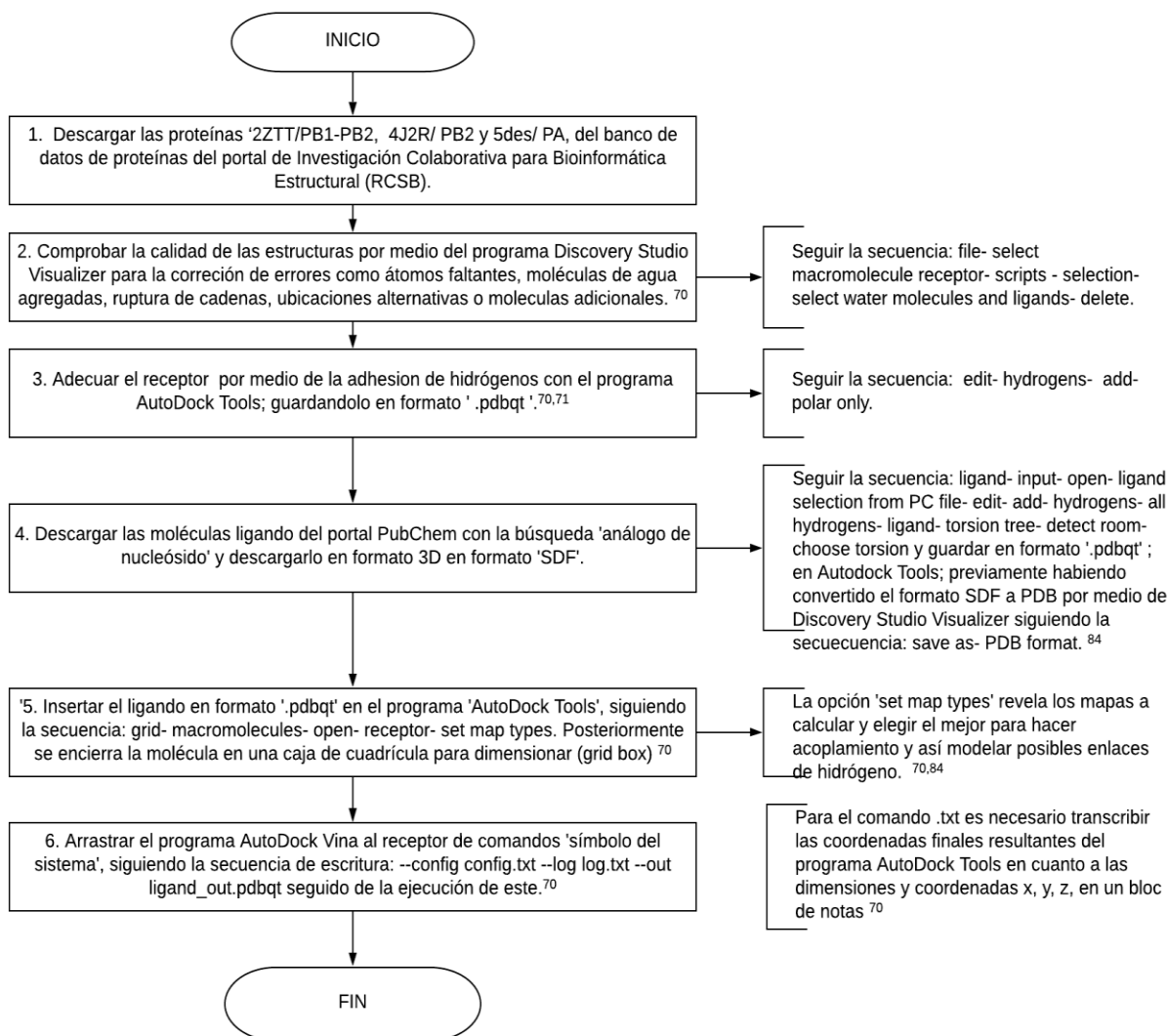
- **OBTENCION Y ANALISIS DE SECUENCIAS DEL VIRUS DE LA INFLUENZA A H1N1**

PROCEDIMIENTO PARA LA OBTENCIÓN Y ANALISIS DE SECUENCIAS DEL VIRUS DE LA INFLUENZA A H1N1



- **DOCKING MOLECULAR**

PROCEDIMIENTO PARA DOCKING MOLECULAR



4. RESULTADOS

4.1. CONSERVACIÓN DE SECUENCIAS DE AMINOÁCIDOS DE LOS SEGMENTOS 1, 2 Y 3 DEL VIRUS DE LA INFLUENZA A (H1N1)

Con ayuda de “Uniprogene” se muestra el porcentaje de similitud en la alineación que tienen las secuencias del virus; para lo cual se determinó que las secuencias altamente conservadas tienen

un porcentaje de similitud en sus residuos de 95-100%, (color rojo) las que son conservadas un 95-80% (color amarillo), variable 80-30% (color verde) y altamente variable de 30- 0% (color gris).^{76,86}

4.1.1. SEGMENTO 1

Tabla 3. Porcentaje de conservación de secuencias de aminoácidos de la proteína PB2 del virus de la Influenza A (H1N1). Ver anexo 1.

Tabla 4. Alineación de aminoácidos de la proteína PB2 del virus de la Influenza A (H1N1). Ver anexo 2.

En las tablas 3 y 4 (ver anexos 1 y 2) se muestra el porcentaje de similitud en la alineación que tienen las secuencias de la proteína PB2 del virus de la Influenza A (H1N1); para lo cual se determinó que las secuencias altamente conservadas tienen un porcentaje de similitud en sus residuos de 95-100%, (color rojo) las que son conservadas un 95-80% (color amarillo), variable 80-30% (color verde) y altamente variable de 30- 0% (color gris).^{76,86}

4.1.2. SEGMENTO 2

Tabla 5. Porcentaje de conservación de secuencias de aminoácidos de la proteína PB1 del virus de la Influenza A (H1N1). Ver anexo 3.

Tabla 6. Alineación de aminoácidos de la proteína PB1 del virus de la Influenza A (H1N1). Ver anexo 4.

En las tablas 5 y 6 (ver anexos 3 y 4) se muestra el porcentaje de similitud en la alineación que tienen las secuencias de la proteína PB2 del virus de la Influenza A (H1N1); para lo cual se determinó que las secuencias altamente conservadas tienen un porcentaje de similitud en sus residuos de 95-100%, (color rojo) las que son conservadas un 95-80% (color amarillo), variable 80-30% (color verde) y altamente variable de 30- 0% (color gris).^{76,86}

4.1.3. SEGMENTO 3

Tabla 7. Porcentaje de conservación de secuencias de aminoácidos de la proteína PA del virus de la Influenza A (H1N1). Ver anexo 5

Tabla 8. Alineación de aminoácidos de la proteína PA del virus de la Influenza A (H1N1). Ver anexo 6

En las tablas 7 y 8 (ver anexos 5 y 6) se muestra el porcentaje de similitud en la alineación que tienen las secuencias de la proteína PB2 del virus de la Influenza A (H1N1); para lo cual se determinó que las secuencias altamente conservadas tienen un porcentaje de similitud en sus residuos de 95-100%, (color rojo) las que son conservadas un 95-80% (color amarillo), variable 80-30% (color verde) y altamente variable de 30- 0% (color gris).^{76,86}

4.1.4. PROTEÍNAS PB1, PB2 Y PA

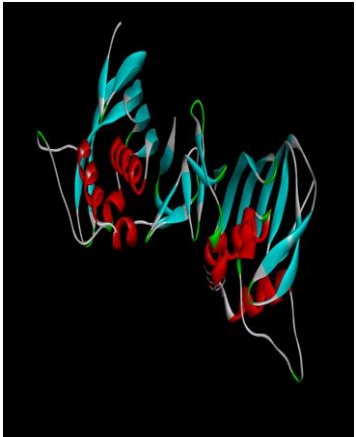


Tabla 9. Porcentaje total de conservación y variabilidad de las proteínas PB1, PB2 y PA del virus de la Influenza A (H1N1)

PROTEÍNA	NUMERO DE SECUENCIAS ANALIZADAS	LONGITUD	NÚMERO Y PORCENTAJE DE SECUENCIAS ALTAMENTE CONSERVADAS	NUMERO Y PORCENTAJE DE SECUENCIAS CONSERVADAS	NÚMERO Y PORCENTAJE DE SECUENCIAS VARIABLES	NÚMERO Y PORCENTAJE DE SECUENCIAS ALTAMENTE VARIABLES
PB1	354	757 aminoácidos	723 (95,5%)	30 (3,96%)	4 (0,69%)	0 (0%)
PB2	355	759 aminoácidos	713 (93,9%)	39 (5,13%)	5 (0,65%)	2 (0,26%)
PA	361	716 aminoácidos	688 (96,0%)	25 (3,49%)	3 (0,41%)	0 (0%)

Las proteínas con mayor porcentaje de conservación en sus residuos de aminoácidos fueron la proteína PB1 y PA, respectivamente con 723 secuencias de aminoácidos equivalente a un 95,5% de residuos y 688 secuencias equivalente a un 96% de alta conservación; siendo este un porcentaje favorable para proponer una molécula farmacológica que actúe en la intervención de la elongación del virus y en la interacción con las PA / P3 y PB2²⁴, para así poder intervenir en la acción de la enzima RdRp.

4.2. DOCKING MOLECULAR

Tabla 10. Estructuras cristalizadas de las proteínas receptoras del virus de la Influenza A (H1N1).

		
<p>Imagen 2.</p> <p>4J2R / PB2</p> <p>Cepa: A / Puerto Rico / 8/1934 H1N1</p> <p>Proteína tomada de: http://www.rcsb.org/structure/4J2R</p>	<p>Imagen 3.</p> <p>5DES / PA</p> <p>Cepa: Swl A / California / 04/2009 H1N1</p> <p>Proteína tomada de : https://www.rcsb.org/structure/5des</p>	<p>Imagen 4.</p> <p>2ZTT / PB1-PB2</p> <p>Cepa: A / Puerto Rico / 8/1934 H1N1</p> <p>Proteína tomada de: https://www.rcsb.org/structure/2ztt</p>

Estas proteínas fueron obtenidas gracias al método de difracción de rayos X. La cristalización de la proteína 4J2R / PB2 fue obtenida por Qiu H et al. en el año 2015; la cristalización de la proteína 5DES/ PA fue obtenida por Kumar G et al. en el año 2015 y la cristalización de la proteína 2ZTT/ PB1-PB2 fue obtenida por Sugiyama K et al. en el año 2008^{92,93,94}.

4.2.1. ALINEACIÓN MÚLTIPLE DE PROTEÍNAS RECEPTORAS CRISTALIZADAS

Tabla 11. Secuencias conservadas de la molécula cristalizada 2ZTT / PB1-PB2

679	680	681	682	683	684	685	686	687	688	689	690	691	692	693	694	695	696	697	698	699	700
Q	R	G	I	L	E	D	E	Q	M	Y	Q	K	C	C	N	L	F	E	K	F	F
701	702	703	704	705	706	707	708	709	710	711	712	713	714	715	716	717	718	719	720	721	722
P	S	S	S	Y	R	R	P	V	G	I	S	S	M	V	E	A	M	V	S	R	A
723	724	725	726	727	728	729	730	731	732	733	734	735	736	737	738	739	740	741	742	743	744
R	I	D	A	R	V	D	F	E	S	G	R	I	K	K	E	E	F	S	E	I	M
745	746	747	748	749	750	751	752	753	754	755	756	757									
K	I	C	S	T	I	E	E	L	R	R	Q	K									

Color rojo: Secuencias altamente conservadas (95% - 100%). Color amarillo: Secuencias conservadas (80% - 95%).

Tabla 12. Secuencias conservadas de la proteína cristalizada 4J2R / PB2

314	315	316	317	318	319	320	321	322	323	324	325	326	327	328	329	330	331	332	333	334	335	336
A	I	G	L	R	I	S	S	S	F	S	F	G	G	F	T	F	K	R	T	S	G	S
337	338	339	340	341	342	343	344	345	346	347	348	349	350	351	352	353	354	355	356	357	358	359
S	V	K	K	E	E	E	V	L	T	G	N	L	Q	T	L	K	I	R	V	H	E	G
360	361	362	363	364	365	366	367	368	369	370	371	372	373	374	375	376	377	378	379	380	381	382
Y	E	E	F	T	M	V	G	R	R	A	T	A	I	L	R	K	A	T	R	R	L	I
383	384	385	386	387	388	389	390	391	392	393	394	395	396	397	398	399	400	401	402	403	404	405
Q	L	I	V	S	G	R	D	E	Q	S	I	A	E	A	I	I	V	A	M	V	F	S
406	407	408	409	410	411	412	413	414	415	416	417	418	419	420	421	422	423	424	425	426	427	428
Q	E	D	C	M	I	K	A	V	R	G	D	L	N	F	V	N	R	A	N	Q	R	L
429	430	431	432	433	434	435	436	437	438	439	440	441	442	443	444	445	446	447	448	449	450	451
N	P	M	H	Q	L	L	R	H	F	Q	K	D	A	K	V	L	F	Q	N	W	G	I
452	453	454	455	456	457	458	459	460	461	462	463	464	465	466	467	468	469	470	471	472	473	474
E	S	I	D	N	V	M	G	M	I	G	I	L	P	D	M	T	P	S	T	E	M	S
475	476	477	478	479	480	481	482	483	484	485	486	487										
L	R	G	I	R	V	S	K	M	G	V	D	E										

Color rojo: Secuencias altamente conservadas (95% - 100%). Color amarillo: Secuencias conservadas (80% - 95%).

Tabla 13. Secuencias conservadas de la proteína cristalizada 5des / PA

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
M	E	D	F	V	R	Q	C	F	N	P	M	I	V	E	L
17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32
A	E	K	A	M	K	E	Y	G	E	D	P	K	I	E	T
33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48
N	K	F	A	A	I	C	T	H	L	E	V	C	F	M	Y
49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64
S	D	F	H	F	I	D	E	R	G	E	S	I	I	V	E
65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80
S	G	D	P	N	A	L	L	K	H	R	F	E	I	I	E
81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96
G	R	D	R	I	M	A	W	T	V	V	N	S	I	C	N
97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112
T	T	G	V	E	K	P	K	F	L	P	D	L	Y	D	Y
113	114	115	116	117	118	119	120	121	122	123	124	125	126	127	128
K	E	N	R	F	I	E	I	G	V	T	R	R	E	V	H
129	130	131	132	133	134	135	136	137	138	139	140	141	142	143	144
I	Y	Y	L	E	K	A	N	K	I	K	S	E	K	T	H
145	146	147	148	149	150	151	152	153	154	155	156	157	158	159	160
I	H	I	F	S	F	T	G	E	E	M	A	T	K	A	D
161	162	163	164	165	166	167	168	169	170	171	172	173	174	175	176
Y	T	L	D	E	E	S	R	A	R	I	K	T	R	L	F
177	178	179	180	181	182	183	184	185	186	187	188	189	190	191	192
T	I	R	Q	E	M	A	S	R	S	L	W	D	S	F	R
193	194	195	196	197	198	199									
Q	S	E	R	G	E	E									

Color rojo: Secuencias altamente conservadas (95% - 100%). Color amarillo: Secuencias conservadas (80% - 95%).

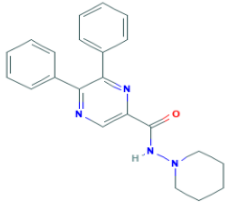
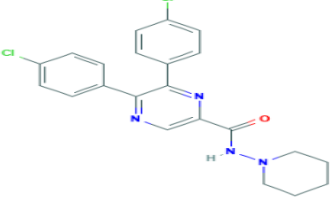
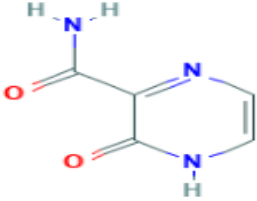
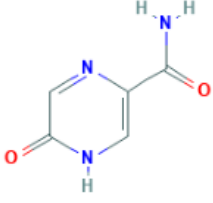
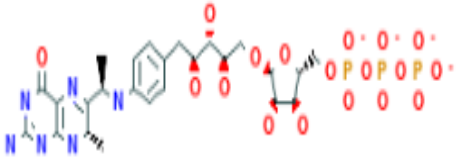
Tabla 14. Porcentaje de similitud en las secuencias de las proteínas cristalizadas 2ZTT / PB1-PB2, 4J2R / PB2 y 5des / PA

PROTEÍNA CRISTALIZADA	NUMERO DE SECUENCIAS ANALIZADAS	NUMERO Y PORCENTAJE DE SECUENCIAS ALTAMENTE CONSERVADAS	NÚMERO Y PORCENTAJE DE SECUENCIAS CONSERVADAS	NÚMERO Y PORCENTAJE DE SECUENCIAS VARIABLES
2ZTT / PB1-PB2	93	78 (93,6%)	5 (6,4%)	-
4J2R / PB2	186	173 (92,6%)	11 (6,3%)	2 (1,1%)
5des / PA	199	191 (96,0%)	8 (4,0%)	-

Según la tabla 11, se puede identificar que las secuencias de aminoácidos de las proteínas cristalizadas son altamente conservadas, ya que más del 90% de estas secuencias en cada una de las 3 proteínas presentan alta conservación; lo que determina la viabilidad de estas proteínas como receptores de un posible ligando.

4.2.2. MOLÉCULAS LIGANDO

Tabla 15. Moléculas obtenidas como potenciales ligandos.

MOLÉCULA LIGANDO	INFORMACIÓN
	<p>Imagen 5.</p> <p>PubChem CID :9906800 Fórmula Molecular: C₂₂H₂₂N₄O Nombre IUPAC : 5,6-difenil-N-piperidin-1-ilpirazina-2-carboxamida</p>
	<p>Imagen 6.</p> <p>PubChem CID :10216596 Fórmula Molecular: C₂₂H₂₀Cl₂N₄O Nombre IUPAC : 5,6-bis (4-clorofenil) - N-piperidin-1-ilpirazina-2-carboxamida</p>
	<p>Imagen 7.</p> <p>PubChem CID :294642 Fórmula Molecular: C₅H₅N₃O₂ Nombre IUPAC :2-oxo- 1H -pirazina-3-carboxamida</p>
	<p>Imagen 8.</p> <p>PubChem CID :151823 Fórmula Molecular: C₅H₅N₃O₂ Nombre IUPAC :6-oxo- 1H -pirazina-3-carboxamida</p>
	<p>Imagen 9.</p> <p>PubChem CID : 84974922 Nombre suministrado por depositante:[1-(2-amino-7-metil-4-oxo-7,8-dihidro-3H-pteridin-6-il)] etil- (4-aminofenil) -1-deoxi-5- [1-alfa - D- ribofuranosil trifosfato] -D-ribitol</p>

En la tabla 12 se pueden observar cinco moléculas ligando obtenidas del banco de datos de proteínas del centro de investigación colaborativa de estructuras bioinformáticas- RCSB; las cuales dos de ellas son derivadas del compuesto pirazinacorbazamida y tres de ellas análogas al favirpiravir.

Tabla 16. Afinidad e interacciones del receptor 4J2R con cada molécula ligando.

4J2R		
LIGANDO	AFINIDAD	INTERACCIONES
<p>5,6-difenil-N-piperidin-1-ilpirazina-2-carboxamida</p> <p>Imagen 10</p>	-8.0 kcal/mol	
<p>5,6-bis (4-clorofenil) - N -piperidin-1-ilpirazina-2-carboxamida</p> <p>Imagen 11.</p>	-7.7 kcal/mol	

<p>2-oxo- <i>1H</i> -pirazina-3-carboxamida</p> <p>Imagen 12.</p>	<p>-4.4 kcal/mol</p>	
<p>6-oxo- <i>1H</i> -pirazina-3-carboxamida</p> <p>Imagen 13.</p>	<p>-4.2 kcal/mol</p>	
<p>: [1- (2-amino-7-metil-4-oxo-7,8-dihidro-3H-pteridin-6-il)] etil- (4-aminofenil) -1-deoxi-5- [1-alfa - D-ribofuranosil trifosfato] -D-ribitol</p> <p>Imagen 14.</p>	<p>-6.0 kcal/mol</p>	

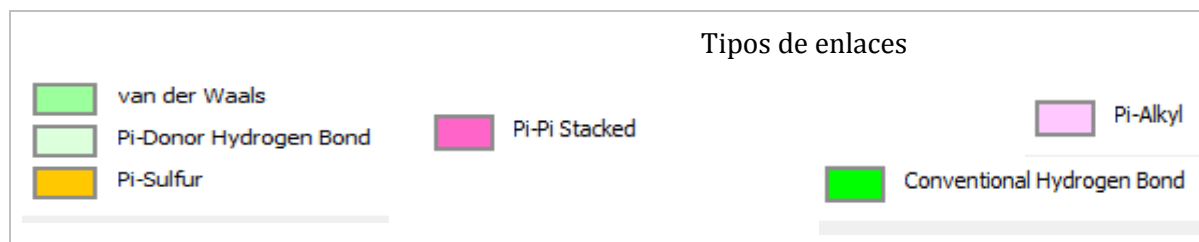
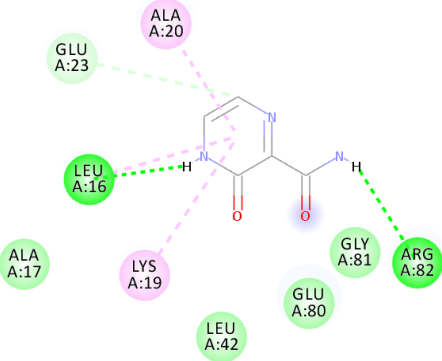
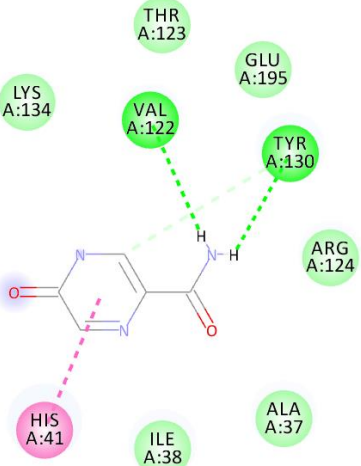
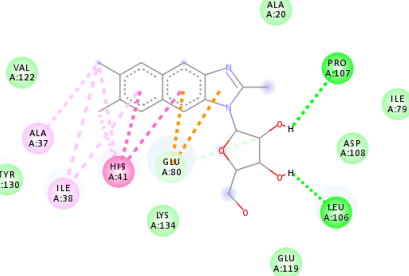


Tabla 17. Afinidad e interacciones del receptor '5des' con cada molécula ligando

5DES		
LIGANDO	AFINIDAD	INTERACCIONES
<p style="text-align: center;">5,6-difenil-N-piperidin-1-ilpirazina-2-carboxamida</p> <p style="text-align: center;">Imagen 15.</p>	<p>-7.9 kcal/mol</p>	
<p style="text-align: center;">5,6-bis (4-clorofenil) - N-piperidin-1-ilpirazina-2-carboxamida</p> <p style="text-align: center;">Imagen 16.</p>	<p>-6.8 kcal/mol</p>	

<p>2-oxo- <i>1H</i> -pirazina-3-carboxamida</p> <p>Imagen 17</p>	<p>-4.5 kcal/mol</p>	
<p>6-oxo- <i>1H</i> -pirazina-3-carboxamida</p> <p>Imagen 18.</p>	<p>-4.3 kcal/mol</p>	
<p>[1- (2-amino-7-metil-4-oxo-7,8-dihidro-3H-pteridin-6-il)] etil- (4-aminofenil) -1-deoxi-5-[1-alfa - D-ribofuranosil trifosfato] -D-ribitol</p> <p>Imagen 19.</p>	<p>-6.6 kcal/mol</p>	

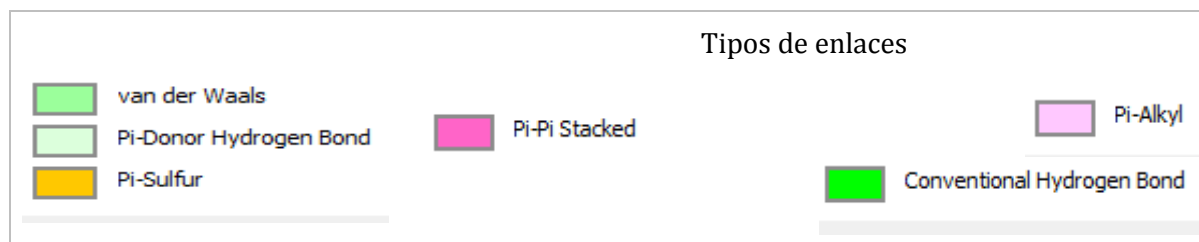
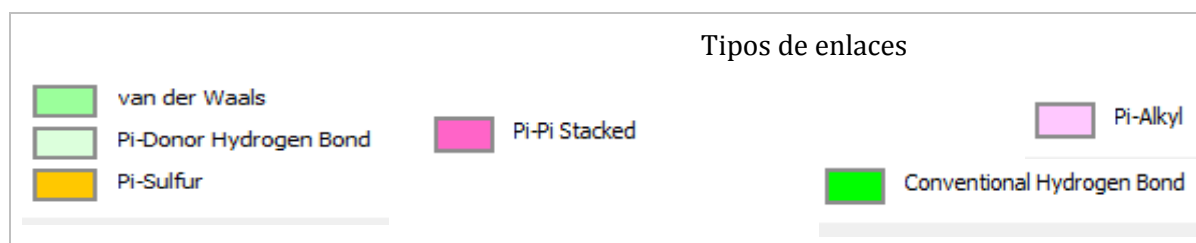


Tabla 18. Afinidad e interacciones del receptor '2ZTT' con cada molécula ligando.

2ZTT		
LIGANDO	AFINIDAD	INTERACCIONES
<p>5,6-difenil-N-piperidin-1-ilpirazina-2-carboxamida</p> <p>Imagen 20.</p>	<p>-8.6 kcal/mol</p>	
<p>5,6-bis (4-clorofenil) - N -piperidin-1-ilpirazina-2-carboxamida</p> <p>Imagen 21.</p>	<p>-8.0 kcal/mol</p>	

<p>2-oxo- 1H -pirazina-3-carboxamida</p> <p>Imagen 22.</p>	<p>-5.2 kcal/mol</p>	
<p>6-oxo- 1H -pirazina-3-carboxamida</p> <p>Imagen 23.</p>	<p>-4.7 kcal/mol</p>	
<p>:[1- (2-amino-7-metil-4-oxo-7,8-dihidro-3H-pteridin-6-il)] etil- (4-aminofenil) -1-deoxi-5- [1-alfa - D-ribofuranosil trifosfato] -D-ribitol</p> <p>Imagen 24.</p>	<p>-6.0 kcal/mol</p>	



En las tablas 13, 14 y 15 se observan las interacciones obtenidas entre los ligandos y las

proteínas receptoras; específicamente se pueden identificar las posiciones de aminoácidos en las que se genera un buen acoplamiento gracias a que tienen la mejor afinidad, como es el caso del 5,6-difenil-N-piperidin-1-ilpirazina-2-carboxamida, cuya afinidad con las tres proteínas fue de -8,0, -7,9 y -8,6 kcal/mol respectivamente.

5. DISCUSIÓN

Gracias a la alineación de secuencias de aminoácidos de las proteínas PB1, PB2 y PA que conforman la enzima RdRp del virus de la Influenza A H1N1, es posible determinar el grado o porcentaje de conservación o variabilidad que estas posean. La alineación múltiple ayuda a identificar similitudes funcionales y estructurales, así como las diferencias entre múltiples secuencias biológicas; comparando las secuencias nuevas o desconocidas, con las secuencias estudiadas o conocidas. En este estudio se determinó la similitud y la variabilidad entre secuencias de aminoácidos de las proteínas PB1, PB2 y PA del virus de la Influenza A (H1N1), reportados en la base de datos del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI) desde el año 2000 hasta el año 2017 en el continente suramericano.

Teniendo en cuenta la comprobación de la conservación de secuencias de aminoácidos de las proteínas PB1, PB2 y PA, este estudio generó una propuesta de docking molecular para la búsqueda de una molécula de uso farmacológico que pueda bloquear la acción de la enzima RdRp del virus de la Influenza A (H1N1). Como se puede observar en la tabla 6 se tomaron tres secuencias de proteínas cristalizadas en las bases de datos, las cuales actúan como receptoras de la molécula de uso farmacológico ligando teniendo como criterio de búsqueda la disponibilidad de estas en la base de datos Protein Data Bank; siendo estas ‘2ZTT’ equivalente a PB1-PB2, ‘4J2R’ equivalente a PB2 y ‘5des’ equivalente a PA.^{92,93,94} Estas secuencias fueron obtenidas de cepas del virus de la Influenza A (H1N1) correspondientes al estado de California en Estados Unidos del año 2009 y de Puerto Rico en el año 1934.⁹² Siendo estas secuencias reportadas en alineación de aminoácidos, demostrando luego de la alineación múltiple una conservación similar a las secuencias del continente suramericano, como se puede observar en la tabla 10, con un alto porcentaje de conservación que oscila entre el 92 al 96% del total de secuencias. Lo que permite determinar en una segunda ocasión, que los aminoácidos que componen las proteínas que conforman la enzima RdRp del virus de la Influenza A (H1N1), son altamente conservados y puede ser más viable un fármaco antiviral que actúe sobre esta ubicación diana.

Existen antivirales para el tratamiento del virus de influenza A (H1N1) como oseltamivir y zanamivir, cuyo mecanismo de acción es el bloqueo de la proteína neuraminidasa, evitando la

ruptura del ácido siálico en el enlace α -cetósido³⁴. Sin embargo, las mutaciones que sufre esta proteína debido a la recombinación genética, genera cambios estructurales y funcionales, lo que hace que se dificulte su acción y por ende promueve la enfermedad. Es por esto que se convierte en una necesidad el uso de un fármaco antiviral que actúe sobre sitios en los que se compruebe la alta conservación, para que así la dinámica del fármaco no se vea comprometida; tal es el caso del antiviral favipiravir. Este antiviral es un derivado del compuesto pirazinacorbaxamida dirigido para actuar sobre la enzima RdRp, siendo el fármaco más utilizado para el tratamiento de la Influenza. Intracelularmente es convertido a Ribomonofosfato (RMP) y posteriormente por las quinasas celulares se transforma a la forma activa Ribofuranosil trifosfato.

Según la composición y dinámica del favipiravir, se identificaron sustancias similares a éste para proponer una molécula ligando que pueda servir como una componente antiviral para el tratamiento farmacológico de la Influenza A (H1N1). Como se observa en la tabla 12 se encontraron cinco compuestos potenciales para ser moléculas ligando; dos de ellos derivados de la pirazinacorbaxamida y tres compuestos análogos del favipiravir. Se caracterizó la interacción ‘ligando-receptor’ según su afinidad, siendo está definida como la fuerza de interacción entre dos moléculas que se unen de forma reversible; en donde valores más negativos indican mayores energías de unión.⁸⁷ El compuesto con mejor afinidad que se tomó es el compuesto 5,6-difenil-N-piperidin-1-ilpirazina-2-carboxamida, pues según las tablas 13, 14 y 15, tuvo la mayor afinidad, con valores de -8.0 Kcal/mol, -7.9 Kcal/mol y -7.6 Kcal/mol respectivamente con cada receptor. De igual manera esta fuerza de unión fue dada específicamente en sitios altamente conservados así: Receptor 4J2R: LYS 443; PHE446; MET467; GLN392; ALA442; ALA395 y GLN439. Receptor 5DES: PHE105; ARG84; LEU106; LYS19; LEU16; ALA20 y GLU80. Receptor 2ZTT: PHE696; CYS693 y ARG707. Estas interacciones fueron posibles gracias a la creación de enlaces covalentes, enlaces PI, enlaces convencionales de hidrógenos, así como fuerzas de Van der Waals, lo que permite entender las interacciones entre estos compuestos sobre las proteínas en estudio.

Las interacciones a nivel intracelular se consideraron a partir del ligando con mejor afinidad y de acuerdo a su acción bioquímica; en este caso fue el 5,6-difenil-N-piperidin-1-ilpirazina-2-carboxamida. La porción pirazinacarboxamida es utilizada intracelularmente por las quinasas

para su posterior transformación a ribofuranosil trifosfato. La porción piperidinil es una amina heterocíclica conformada por un anillo de seis miembros que contienen cinco metilenos y un átomo de nitrógeno el cual está unido a un grupo funcional.⁸⁸ La porción difenil, es la composición de dos grupos fenilo, el cual es un grupo funcional cíclico ubicado en los carbonos 5 y 6 de la molécula. Es un radical arilo monovalente, estrechamente relacionado con el benceno y derivado del mismo, mediante la eliminación de un átomo de hidrógeno ⁸⁹. Los elementos fundamentales que determinan el paso de cualquier sustancia química a través de una membrana biológica son el tamaño molecular, la liposolubilidad y el estado de ionización de la molécula ⁹⁰. El 5,6-difenil-N-piperidin-1-ilpirazina-2-carboxamida tiene un peso de 358.445 g/mol, Tiene cuatro hidrógenos aceptores y un hidrógeno donador, lo que permite que la molécula interactúa con el agua intersticial. Para que este compuesto llegue a circulación y logre la interacción con la membrana celular, se debe considerar un tipo de transporte activo, ya que este se asocia al transporte de iones H⁺ o NA⁺; lo que en las posiciones N3, N4 y N5 de la molécula ligando se encuentren hidrógenos apolares que interactúan mejor con el medio; además de tener en su estructura un grupo difenil análogo del benceno, lo cual lo hace liposoluble facilitando su ingreso a la célula.

El 5,6-difenil-N-piperidin-1-ilpirazina-2-carboxamida logró el acoplamiento molecular a través de enlaces tipo PI, los cuales son un enlace covalente el cual ocurre cuando el solapamiento se produce entre orbitales de ejes paralelos⁹¹, además de la fuerza de Van der Waals la cual, es la fuerza atractiva o repulsiva entre moléculas (o entre partes de una misma molécula) debidas al enlace covalente o a la interacción electrostática de iones con otros o con moléculas neutras.⁸⁸ Según esto, el compuesto puede ser activo y acoplarse contra la enzima RdRp del virus de la Influenza A (H1N1), ya que la pirazinacorbaxamida logró un enlace PI en el docking molecular y tres interacciones de tipo fuerza de Van der Waals a partir de esto se establece que el favipiravir si podría actuar y acoplarse a las proteínas de la RdRp antes de ser modificado por las quinasas celulares.

La molécula ligando análoga al antiviral favipiravir fue 2-oxo- 1H -pirazina-3-carboxamida, como se puede observar en las tablas 13, 14 y 15; la cual logró una afinidad a las moléculas receptoras de -4.4 Kcal/mol, -4.5 Kcal/mol y -5.2 Kcal/mol, respectivamente. Es un compuesto

denominado pirazinacarboxamida, 3,4-dihidro-3-oxo. En primera instancia es posible que su baja afinidad sea dada por los pocos sitios de interacción que posee, también es una molécula de bajo peso (139.114 g/mol). A diferencia del favipiravir, el ligando Hidroxi-carboxi no posee grupo fluoruro y tiene un tamaño que oscila entre pequeño y mediano, permitiendo su paso por membrana a través de difusión pasiva. Intracelularmente es posible que sea transformado por las quinasas celulares y sufra una transformación similar a la del favipiravir. En el docking molecular con esta molécula se observan enlaces tipo PI y enlaces convencionales covalentes gracias a la presencia de hidrógenos aceptores. Estos enlaces en su totalidad tuvieron acoplamiento en sitios conservados de la enzima RdRp del virus de la Influenza A (H1N1).

En la subunidad PA ocurre el procesamiento del pre-ARNm del huésped para luego servir como cebador para el ARNm viral. También, esta subunidad tiene asociación con el sitio estructural G, el cual comparten todos los organismos que poseen una enzima RdRp.⁹² De los residuos importantes para realizar acoplamiento con la proteína PA se encontraron Tyr24 y Lys34,⁹⁸ de los cuales se logró demostrar que son altamente conservados. La subunidad PB1 es importante para que inicie la activación de la polimerasa y la unión cap entre el ARN viral. De esta subunidad, los residuos importantes para realizar el acoplamiento molecular son Leu685, Phe700 y Val715, ya que se logró demostrar que son sitios altamente conservados en diferentes subtipos de Influenza A.⁹²

En última instancia, existe la posibilidad que el a ribofuranosil trifosfato sea el compuesto que interaccione de manera óptima con la enzima RdRp del virus de la Influenza A (H1N1), ya que sus enlaces en el docking molecular, fueron de tipo convencional con hidrógenos en sitios conservados de la proteína de la porción trifosfato y enlaces tipo PI en interacción con el ribofuranosil del compuesto estudiado; además de las fuerzas de van der Waals que está interacciones genera.

6. CONCLUSIONES

- Fue posible determinar las regiones genómicas conservadas de las proteínas PB1, PB2 y PA del virus de la Influenza A (H1N1) reportadas en la base de datos del NCBI del continente suramericano, ya que las herramientas bioinformáticas permitieron demostrar que tienen un alto porcentaje de conservación, pues más del 90% de los aminoácidos de las tres proteínas tienen una similitud entre las diferentes secuencias de 95 y el 100%.
- Se logró identificar que los compuestos con mayor tamaño como 5,6-difenil-N-piperidin-1-ilpirazina-2-carboxamida y 6-oxo-1h-pirazina-3-carboxamida son los ligandos más apropiados para generar docking molecular en más sitios de unión con las tres proteínas receptoras cristalizadas, mostrando siete acoplamientos con enlaces de tipo covalente lo que hace que aumente la afinidad y por ende tengan la mejor interacción ligando-receptor; con el fin de demostrar que estas interacciones se generan en sitios conservados de la enzima RdRp, facilitando su inhibición y por ende la interrupción de la replicación virus de la Influenza A (H1N1).
- Se logró demostrar por medio de bioinformática las interacciones ligando-receptor que existen entre moléculas cristalizadas del virus de la Influenza A (H1N1) y moléculas farmacológicas afines a las regiones conservadas de estas moléculas. Estas interacciones demostraron tener una alta viabilidad para la generación de acoplamiento molecular para futuras investigaciones y experimentaciones en el campo de la generación de nuevos fármacos antivirales que sirvan como tratamiento para la Influenza e incluso para virus que tengan la enzima RdRp. Esto también teniendo en cuenta todos los continentes del mundo, ya que Suramérica demostró buenos resultados de conservación de secuencias.
- Se necesita que estos estudios *in silico* sean validados por medio de la experimentación *in vivo* o *in vitro*, pues esto demostraría la posibilidad de generar un nuevo tratamiento para la Influenza y de esta manera se podrían seguir promoviendo los estudios acerca de la investigación y el manejo para esta enfermedad.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ¹. Heather J. Chain B. The sequence of sequencers: The history of sequencing dna. elsevier [Internet].2016 [citado abr 15 2018]; (107): 1–6. Disponible en: http://docente.unife.it/silvia.fuselli/dispense-corsi/Heather%20and%20Chain_NGS_Genomics%202016.pdf
- ². Talledo M. Zumaeta K. Los virus Influenza y la nueva pandemia A/H1N1 . Scielo [Internet].2009 [citado febrero 1 2019]; 16(2): 227–237. Disponible en: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1727-99332009000200018
- ³. Duarte A. Salinas R. Morbilidad y mortalidad por influenza A H1N1 en la Jurisdicción Sanitaria número 1 en Chihuahua, Chihuahua. Medigraphic [Internet].2013 [citado sep 1 2018]; 6 (1) 6–10. Disponible en: <http://www.medigraphic.com/pdfs/evidencia/eo-2013/eo131b.pdf>
- ⁴. Suárez L. Juan A. Gómez J. Cesar M. Aquiler V. et al. Mortalidad relacionada a influenza A H N en el Perú durante la pandemia en 2009-2010. Revista Peruana de Epidemiología [Internet].2018 [citado sep 5 2018]; 1–6. Disponible en: http://sisbib.unmsm.edu.pe/bvrevistas/epidemiologia/v15_n1/pdf/a04.pdf
- ⁵. Ministerio de la salud de Argentina. Influenza pandémica (h1n1) 2009. República argentina [Internet] Argentina: Presidencia de la nación; 2009 [Actualizado 13/08/2009; citado 15 feb 2019]; Disponible en: <http://www.femeba.org.ar/documentos/download/529-informe-se-31-com-arg-1.pdf>
- ⁶. Bellei N. Melchior TB.. H1N1: pandemia e perspectiva atual. Scielo [Internet].2011 [citado feb 15 2019]; 47(6): 611–617. Disponible en: <http://www.scielo.br/pdf/jbpml/v47n6/v47n6a07.pdf>
- ⁷. PAHO. Actualización semanal pandemia (h1n1) 2009 [Internet] Chile; 2009 [Actualizado 22 de dic 2009; citado 15 feb 2019]; Disponible en: http://www1.paho.org/hq/dmdocuments/2009/Informe_semanal_SE49.pdf
- ⁸. Dabanch J. Influenza A (H1N1) 2009: pandemia en Chile. Medwave [Internet].2010 [citado feb 10 2018]; (4): 1–8. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/271255894_Influenza_A_H1N1_2009_pandemia_en_Chile
- ⁹. PAHO. 2019 Weekly / Semanal Influenza Report EW 6/ Reporte de Influenza SE 6 [Internet]. 2019 [Actualizado 11 de dic 20019; Consultado, 12 feb del 2019]; Disponible en: https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&view=download&category_slug=2019-1&alias=47779-actualizacion-regional-influenza-semana-epidemiologica-6-19-de-febrero-2019&Itemid=270&lang=es

10. Subdirección de Enfermedades Transmisibles Dirección de Promoción y Prevención Dirección de Epidemiología y Demografía. Lineamientos para la prevención, diagnóstico, manejo y control de casos de Influenza. [Internet] 2018 [Actualizado jun 2018; consultado 2018 sep 12]. Disponible en: <https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/VS/PP/lineamientos-prevencion-diagnostico-manejo-control-casos-influenza.pdf>
11. CDC. [Internet] Clifton Road Atlanta; 2018-2019 [Actualizado 10 de feb 2019; citado 15 feb 2019]; <https://espanol.cdc.gov/enes/flu/weekly/flusight/index.html>
12. Stamatakis A. Phylogenetics: Applications, Software and Challenges [Internet].2018 [citado abr 16 2018];(2) 301–306. Disponible en: <https://sco.h-its.org/exelixis/pubs/CGP2005.pdf>
13. Robert E. Sjölander K. comparison of scoring functions for protein sequence profile alignment [Internet].2018 [citado abr 17 2018]; 1–6. Disponible en: <http://www.drive5.com/papers/profprofacc.pdf>
14. Rhee Yon S. Dickerson J. Xu D. Bioinformatics and Its Applications in Plant Biology [Internet].2018 [citado abr 27 2018]; 335–352. Disponible en: <https://www.arabidopsis.org/about/bioinformatics.pdf>
15. Silva C. Tanaka H. Nakamura S. Goto N. Yasunaga T. A comprehensive analysis of reassortment in influenza A virus[Internet].2018 [citado abr 17 2018]; 386–389. Disponible en: <http://bio.biologists.org/content/biolopen/1/4/385.full.pdf>
16. Halperin I. Buyong M. Wolfson H. Nussinov R. Principles of Docking: An Overview of Search Algorithms and a Guide to Scoring Functions [Internet].2018 [citado abr 17 2018]; 409–433. Disponible en: <http://www.utdallas.edu/~sxb027100/dock/47-409.pdf>
17. Rhee Yon S. Dickerson J. Xu D. Bioinformatics and Its Applications in Plant Biology [Internet].2018 [citado abr 27 2018]; 335–352. Disponible en: <https://www.arabidopsis.org/about/bioinformatics.pdf>
18. Guan B. Zhang C. Zhao Y. higa .A Running History Information Guided Genetic Algorithm for Protein–Ligand Docking NCBI [Internet].2018 [citado abr 17 2018]; 1–18. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29244750>
19. Gutiérrez- salinas J. Mondragon- teran P. Garcia- Ortiz L.Hernandez- Rodriguez S. et Al. Virus de la influenza humana como ejemplo de enfermedad emergente en México.[Internet].2018 [citado abr 27 2018]; 213–223. Disponible en:<http://www.medigraphic.com/pdfs/medintmex/mim-2016/mim162i.pdf>

20. Chiesa I.J. Chinto J. Silvia-perez M. Nahuel Paliairis J. García M.G. et Al. Circulación de virus de influenza A y cepas resistentes a oseltamivir en el período invernal del año 2013. SCIELO [Internet].2018 [citado abr 27 2018]; 213–223. Disponible en:<http://www.scielo.org.ar/pdf/ramer/v15n4/v15n4a05.pdf>
21. Salazar MA. Ortega O. Leon G. Ramires JE. Castro ME. El origen de la variabilidad genética de los virus de la influenza . Gac Méd [Internet].2010 [citado feb 5 2019]; 146(3): 199-205. Disponible en: http://docente.unife.it/silvia.fuselli/dispense-corsi/Heather%20and%20Chain_NGS_Genomics%202016.pdf
22. Talavera G. Influenza: Historia de una enfermedad. Rev Biomed [Internet].2000 [citado abr 15 2018]; (107): 58–61. Disponible en: <http://www.revbiomed.uady.mx/pdf/rb991017.pdf>
23. López M. García J. Dominguez R. Lozano M. La influenza A/H1N1 2009. Una crónica de la primera pandemia del siglo XXI. Revista Digital Universitaria. [Internet].2018 [citado abr 27 2018]; 1 (4) 3–4. Disponible en:<http://www.ru.tic.unam.mx/bitstream/handle/123456789/1611/961.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
24. Fodor E. Aatjan JW . Influenza virus RNA polymerase: insights into the mechanisms of viral RNA synthesis. PMC (NCBI) [Internet].2016 [citado abr 15 2018]; 14(8): 1–6. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4966622/pdf/emss-69169.pdf>
25. Boivin S. Cusak S. Ruigrok RW. Darren J. Influenza A Virus Polymerase: Structural Insights into Replication and Host Adaptation Mechanisms. JBC [Internet].2010 [citado feb 2 2019]; 285(37): 28411–28417. Disponible en: <http://www.jbc.org/content/285/37/28411.full.pdf>
26. Salazar M.I. Gonzalez-Duran E. Leon-Avila G. Castro-Mussot M.E. Variación genética y antigénica del virus de la Influenza A I.[Internet].2005 [citado abr 27 2018]; 41 – 54 .Disponible en:https://www.researchgate.net/publication/212201963_Variacion_genetica_y_antigenica_de_los_virus_de_influenza_A?enrichId=rgreq-60e058dd14c131eaae2bb0ba27f36c12-XXX&enrichSource=Y292ZXJQYWdlOzIxMjIwMTk2MztBUzoxMDMzMzA2NTk0Mzg1OTthAMTQwMTY0NzMI1Nzg4OA%3D%3D&el=1_x_3&esc=publicationCoverPdf
27. Stubbs T. Aartjan JW. The RNA-dependent RNA polymerase of the influenza A virus. PMC (NCBI) [Internet].2014 [citado feb 05 2019]; 9(9): 1–21. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4243023/pdf/emss-61130.pdf>
28. Wise HM. Foeglein A. Dalton RM. Patel S. Howard W. et al. Complicated Message: Identification of a Novel PB1-Related Protein Translated from Influenza A Virus Segment 2 mRNA. Journal of Virology [Internet].2009 [citado feb 6 2019]; 83(16): 8021–8031. Disponible en: <https://jvi.asm.org/content/83/16/8021.full>

- ²⁹. Sygum T. Dong L. Wittung P. Tao J. Mapping the domain structure of the influenza A virus polymerase acidic protein (PA) and its interaction with the basic protein 1 (PB1) subunit . ELSEVIER [Internet].2008 [citado ene 15 2019]; (379): 135–142. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0042682208004157>
- ³⁰. Obayashi E. Yoshida H. Kawai F. Shibayama N. Kawaguchi A. Nagata K. et al. He structural basis for an essential subunit interaction in influenza virus RNA polymerase. NATURE [Internet].2008 [citado ene 15 2019]; 454(7208): 1127–31. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18660801>
- ³¹. Manjarres ME. Lopez GA. Virus influenza: Enigma del pasado y del presente. Medigraphic [Internet].2000[citado feb 11 2019];12 (4): 290–297. Disponible en: <http://www.medigraphic.com/pdfs/iner/in-1999/in994h.pdf>
- ³². Skehel J. Gamblin J. Influenza Hemagglutinin and Neuraminidase Membrane Glycoproteins. JBC [Internet].2010 [citado feb 11 2019]; (285): 28403–284096. Disponible en: <http://www.jbc.org/content/285/37/28403.full>
- ³³. Turrel L. Lyall JW. Laurence T. Fodor E. Vreede F. The role and assembly mechanism of nucleoprotein in influenza A virus ribonucleoprotein complexes. Nature [Internet].2013 [citado feb 12 2019]; 4(1591): 1–10. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/ncomms2589><https://www.nature.com/articles/ncomms2589>
- ³⁴ Shtyrya Y.A. Mochalova L.V Bovin N.V. Influenza Virus Neuraminidase: Structure and Function. Naturae [Internet].2009 [citado feb 6 2019]; 1(2): 26–30. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3347517/>
- ³⁵. Manzoor Rashid. Igarashi M. Takada A. Influenza A Virus M2 Protein: Roles from Ingress to Egress. MDPI [Internet].2017 [citado abr 15 2018]; 18(2649): 2–16. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5751251/pdf/ijms-18-02649.pdf>
- ³⁶. Neill RE. Talon J. Palase P. The influenza virus nep (ns2 protein) mediates the nuclear export of viral ribonucleoproteins. EMBO [Internet].1999 [citado feb 12 2019]; 17(1): 288–296. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1170379/pdf/000288.pdf>
- ³⁷. Gutiérrez- salinas J. Mondragon- teran. Garcia- Ortiz L.Hernandez- Rodriguez S. Romero. et al. Virus de la influenza humana como ejemplo de enfermedad emergente en México.[Internet].2018 [citado abr 27 2018]; 213–223. Disponible en:<http://www.medigraphic.com/pdfs/medintmex/mim-2016/mim162i.pdf>

- ³⁸. Fumitaka M. Yuko M. Polycistronic Expression of the Influenza A Virus RNA-Dependent RNA Polymerase by Using the *Thosea asigna* Virus 2A-Like Self-Processing Sequence NCBI [Internet]. 2018 [citado abr 27 2018]; 1-12. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4782009/>
- ³⁹. Samji T. Influenza A: Understanding the Viral Life Cycle. Revista de biología y medicina Universidad de Yale [Internet]. 2009 [citado 13 Agosto 2018]; 82:153-159. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2794490/>
- ⁴⁰. Vlugt C. Sikora D. Pelchat M. Insight into Influenza: A Virus Cap-Snatching. mmpi [Internet]. 2018 [citado feb 12 2019]; 10(641): 1–7. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/329004735_Insight_into_Influenza_A_Virus_Cap-Snatching
- ⁴¹. Braam J. Ulmanen I. Krug RM. Molecular model of a eucaryotic transcription complex: functions and movements of influenza P proteins during capped RNA-primed transcription. cellpres [Internet]. 1990 [citado feb 10 2018]; 34(2): 18–609. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6616622>
- ⁴². Frola S. actualización bibliográfica infección por virus influenza. Sociedad de Infectología de Córdoba [Internet]. 2018 [citado sep 13 2018]; Disponible en: http://www.siccordoba.com/Actualizacion_influenza_junio2016.pdf
- ⁴³. Paciel D. Pérez G. Albornoz H. Medina J. Gripe en el año 2017: novedades y aspectos prácticos. Cátedra de Enfermedades Infecciosas, Fac. de Medicina (UdelaR) [Internet]. 2018 [citado sep 12 2018]; 2–14. Disponible en: <http://www.infectologia.edu.uy/novedades/gripe-en-el-ano-2017-novedades-y-aspectos-practicos>
- ⁴⁴. Huerta A. Gonzales N. Torres A. Influenza A (H1N1): manifestaciones clínicas e indicaciones profilácticas y terapéuticas. elsevier [Internet]. 2010 [citado abr 15 2018]; 46(2): 19-23 Disponible en: <file:///C:/Users/jairoandres/Downloads/S0300289610700168.pdf>
- ⁴⁵. Baehr F. Mackenney J. Influenza A (H1N1): aspectos clínicos de la influenza. Rev med Clin Condes [Internet]. 2014 [citado sep 11 2018]; 25(3): 406-411 Disponible en: <http://www.elsevier.es/es-revista-revista-medica-clinica-las-condes-202-pdf-S0716864014700562>
- ⁴⁶. Mosnier A. Caini S. Daviaud I. Nauleaud E. Tan Bui T. et al. Clinical Characteristics Are Similar across Type A and B Influenza Virus infections plos . [Internet]. 2018 [citado abr 28 2018]; 1–13. Disponible en: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371%2Fjournal.pone.0136186>

47. Rothberg M. Complications of viral Influenza .[Internet].2018 [citado abr 28 2018]; 258 – 262.
Disponible en:
https://www.researchgate.net/publication/210361481_Complications_of_Viral_Influenza
48. Duarte A. Cardenas K. Complicaciones de la infección por el virus de la Influenza AH1N1 en Mexico. Revista mexicana de neurociencia [Internet].2013 [citado feb 11 2019]; 14(1): 17-20.
Disponible en: <http://revmexneuroci.com/wp-content/uploads/2013/10/Nm131-04.pdf>
49. Marques MG. Castro MF. Asisclo J. Hernandez S. Neumonía grave por virus AH1N1: revisión de la bibliografía a propósito de un caso. Actualidades. Int Mex [Internet].2010 [citado feb 20 2019]; 26(5): 516–523. Disponible en: https://www.cmim.org/boletin/pdf2010/MedIntContenido05_15.pdf
50. Fernandez A. Gripe en Pediatría. (upv/ehu) [Internet].2018 [citado sep 12 2018]; 694–701.
Disponible en:https://www.pediatriaintegral.es/wp-content/uploads/2015/xix10/07/n10-694-701_Aristegui.pdf
51. Santos S. Novales M. Influenza. Scielo.[Internet].2018 [citado sep 13 2018]; vol.66 no.5 461 – 471.
Disponible en: <http://www.scielo.org.mx/pdf/bmim/v66n5/v66n5a10.pdf>
52. Rubio M. Mendoza E. Gonzales P. Lozano J. Suarez J. et al. Validación de pruebas alternas en el diagnóstico de influenza. Med Int Méx .[Internet].2018 [citado Septiembre 13 2018]; 2015;31 523-527. Disponible en: <http://www.medigraphic.com/pdfs/medintmex/mim-2015/mim155d.pdf>
53. Centros para el control y la prevención de enfermedades CDC [Internet]. USA [Actualizado 20 de feb 2018; citado 28 abr 2018]. Disponible en:
<https://espanol.cdc.gov/enes/flu/professionals/diagnosis/overview-testing-methods.htm>
54. Paho. [Internet]; 2009 [Actualizado 23 de NOV 2009; citado 15 feb 2019]; Disponible en:
http://www.paho.org/hq/dmdocuments/2010/Spanish-WHO_Diagnostic_RecommendationsH1N1_20090521_mco.pdf
55. Pool M. Huaranga M. Rojas N. Gutierrez V. Ruiton S.et al. Detección de virus influenza a, b y subtipos a (h1n1) pdm09, a (h3n2) por múltiple rt-pcr en muestras clínicas .Rev de Peru Med[Internet]. 2017 [citado feb 9 2019].34(2) 192-200 Disponible en:
<https://www.redalyc.org/pdf/363/36352106005.pdf>
56. Vemula S, Zhao J, Liu J, Wang X, Biswas S, et al. Current Approaches for Diagnosis of Influenza Virus Infections in Humans [Internet]. mdpi Open Access Journals. 2016 [citado 9 Septiembre 2018]. Disponible en: <http://www.mdpi.com/1999-4915/8/4/96/htm>

- ⁵⁷. Ohmit S, Petri J, Cruz R, Johnson E, Influenza Hemagglutination-Inhibition Antibody Titer as a Correlate of Vaccine-Induced Protection. *Revista de enfermedades infecciosas* [Internet]. 2011 [citado 16 September 2018];(12):1879-1885. Disponible en: <https://academic.oup.com/jid/article/204/12/1879/1022792>
- ⁵⁸. Sanders C, Doherty P, Thomas P. Respiratory epithelial cells in innate immunity to influenza virus infection. - PubMed - NCBI [Internet]. Centro Nacional de Información Biotecnológica- NCBI. 2011 [citado 7 Septiembre 2018]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20848130>
- ⁵⁹. Almansa R. Respuesta inmune frente al virus de la gripe | EMEI [Internet]. EMEI. 2012 [citado 28 abr 2018]. Disponible en: <http://epidemiologiamolecular.com/respuesta-inmune-frente-virus-gripe/>
- ⁶⁰. Fariñas Guerrero F. Inmunología, inmunopatología y vacunación en influenza (I) [Internet]. 2016 [citado 28 abr 2018]. Disponible en: http://www.swine-influenza.com/fileadmin/user_upload/download_offen/esp/suis_124_2016_02.pdf
- ⁶¹. Mexas A, Fogle J. et Al. Tompkins M. cd4+cd25+ regulatory T cells are infected and activated during acute FIV infection [Internet]. Centro Nacional de Información Biotecnológica- NCBI. 2008 [citado 7 Septiembre 2018]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2606045/>
- ⁶². Centros para el control y la prevención de enfermedades CDC [Internet]. USA [Actualizado temporada 2018-19; citado 28 abr 2018]. Disponible en: <https://espanol.cdc.gov/enes/flu/protect/vaccine/vaccines.htm>
- ⁶³. Centros para el control y la prevención de enfermedades CDC [Internet]. USA [Actualizado temporada 2018-19; citado 28 abr 2018]. Disponible en: <https://espanol.cdc.gov/enes/flu/treatment/index.html>
- ⁶⁴. Pardo L. Robino L. . Notejane M. Methol G. Giachetto G. Uso racional de oseltamivir. Eficacia e impacto junto a la evidencia actual. *Arch Pediatr* [Internet]. 2017 [citado feb 12 2019]; 88(1): 39–43. Disponible en: <http://www.scielo.edu.uy/pdf/adp/v88n1/v88n1a08.pdf>
- ⁶⁵. Revista cubana de farmacia. Oseltamivir-45 cápsula. *Scielo Revista Cubana de Farmacia* [Internet]. 2011 [citado 7 Septiembre 2018]. 45(3) 462-465 Disponible en: <http://scielo.sld.cu/pdf/far/v45n3/far17311.pdf>
- ⁶⁶. Reina J. Reina N. Favipiravir, un nuevo concepto de fármaco antiviral frente a los virus gripales *Fac Med Unigirona* [Internet]. 2017 [citado feb 12 2019]; 30 (2): 79–82. Disponible en: https://seq.es/wp-content/uploads/2015/02/seq_0214-3429_30_2_reina08feb2017.pdf

- ⁶⁷.Mothertobaby [Internet] [Actualizado noviembre 2017;citado 21 feb 2019]. Disponible en:
<https://mothertobaby.org/es/fact-sheets/medicamentos-antivirales-para-tratarprevenir-la-influenza-gripa/pdf/>
- ⁶⁸.Goldhill D. Aartjan J. Fletcher R. Langat P. Zambon M. et al. The mechanism of resistance to favipiravir in influenza. PNAS [Internet].2018 [citado feb 12 2019];10 (1073) 1–6. Disponible en:
<http://www.scielo.edu.uy/pdf/adp/v88n1/v88n1a08.pdf>
- ⁶⁹.Moreira M. Yruela I. Alineamiento de secuencias, estructura secundaria, desorden y filogenias de proteínas. Fundación ARAID y Estación Experimental de Aula Dei/CSIC, Zaragoza, España [Internet]. [Actualizado 2015, citado feb 10 2019]; Disponible en:
http://digital.csic.es/bitstream/10261/117608/3/Contreras-MoreiraB_alineafilog_ed2018.pdf
- ⁷⁰.Huy R. Garret M. Forli S. Using AutoDock 4 and Vina with AutoDockTools: A Tutoria. The Scripps Research Institute Molecular Graphics Laboratory [Internet].USA [Actualizado 2016 ,citado feb 12 2019]; 1–37. Disponible en: https://seq.es/wp-content/uploads/2015/02/seq_0214-3429_30_2_reina08feb2017.pdf
- ⁷¹.Trott O. Olson A. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization and multithreading. NIH [Internet].2010 [citado feb 25 2019]; 31(2): 2–18. Disponible en:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3041641/pdf/nihms270965.pdf>
- ⁷².Frederick G. Newer influenza antivirals, biotherapeutics and combinations. Blackwell Publishing[Internet].2012 [citado feb 21 2019];7 (1) 63–75. Disponible en:
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/irv.12045>
- ⁷³.Furuta Y. Komeda T. Nakamura T. Favipiravir (T-705), a broad spectrum inhibitor of viral RNA polymerase Takao SEKIYA, M.J.A [Internet].2017 [citado feb 21 2019]; 7 449–461. Disponible en:
<https://pdfs.semanticscholar.org/3077/1b50bc475875491179968e988e12509a7e70.pdf>
- ⁷⁴.Marshal A. Network Protocol Analysis using Bioinformatics Algorithms [Internet]. [citado feb 21 2019]; Disponible en: <http://phreakocious.net/PI/PI.pdf>
- ⁷⁵.Yadav M. Gurmit S. Virtual Screening of Ligand molecules for target protein CYP26A1 by using AutoDock-Vina. ISSN [Internet].2013 [citado feb 15 2019];2(9): 4915–4919. Disponible en:
http://www.ijirset.com/upload/september/72_Virtual.pdf
- ⁷⁶.Marsh G. Rabadan R. Arnold J. Pelese P. Highly Conserved Regions of Influenza A Virus Polymerase Gene Segments Are Critical for Efficient Viral RNA Packaging Mount Sinai School of Medicine [Internet].2007 [citado 7 diciembre 2018] 82 (5) 2295-2303.Disponible en:
<https://jvi.asm.org/content/82/5/2295>

- ⁷⁷. Centros para el control y la prevención de enfermedades CDC [Internet] USA [Actualizado sep 27 2017; citado 28 feb 2019]. Disponible en: <https://espanol.cdc.gov/enes/flu/about/viruses/types.htm>
- ⁷⁸. Centros para el control y la prevención de enfermedades CDC [Internet] USA [Actualizado sep 27 2017; citado 28 feb 2019]. Disponible en: <https://espanol.cdc.gov/enes/flu/pandemic-resources/1918-commemoration/1918-pandemic-history.htm>
- ⁷⁹. Siddhartha K. Boutz P. Debi P. Influenza Virus Nucleoprotein Interacts with Influenza Virus Polymerase Proteins journal of virology [Internet]. 1998 [citado marz 10 2019]; 72(7): 5493–5501. Disponible en: <https://jvi.asm.org/content/jvi/72/7/5493.full.pdf>
- ⁸⁰. Stanley R. Reyes G. Debi P. El virus de la influenza. medigraphic [Internet]. 2007 [citado marz 10 2019]; 66(S1): p12–14. Disponible en: <http://www.medigraphic.com/pdfs/neumo/nt-2007/nts071c.pdf>
- ⁸¹. Rahmadiyan F. Maharani & Tan I. The Role of Trypsin in The InternalizInfluenza H1N1 Virus into Vero and mdck Cells ITB [Internet]. 2012 [citado marz 10 2019]; 44(4): 297-307. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/286166172_The_Role_of_Trypsin_in_The_Internalization_Process_of_Influenza_H1N1_Virus_into_Vero_and_MDCK_Cells
- ⁸². National Center for Biotechnology Information. Nih. Pubchem [Internet] USA ; [Actualizado sep 27 2017; citado 28 feb 2019]. Disponible en: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/492405>
- ⁸³. Meneses A. Rozo L. Franco J. Tecnologías bioinformáticas para el análisis de secuencias de ADN. Rev Universidad Tecnológica de Pereira [Internet]. 2011 [citado mar 20 2019]; 49: 117–121. Disponible en: <http://revistas.utp.edu.co/index.php/revistaciencia/article/view/1491>
- ⁸⁴. Matheus M. Matheus L. Desarrollo de la cristalografía estructural en el siglo XX. Su impacto en las ciencias biomédicas y las perspectivas en este campo. Rev. Cienc. Salud. Bogotá [Internet]. 2007 [citado marz 10 2019]; 5(3): 70-72. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/recis/v5n3/v5n3a7.pdf>
- ⁸⁵. Furuta Y. Takahashi K. Masako K. Sangawa H. Uehara S. et al. Mechanism of Action of T-705 against Influenza Virus. American Society for Microbiology. [Internet]. 2005 [citado marz 10 2019]; 49(3): p. 981–986. Disponible en: <https://aac.asm.org/content/aac/49/3/981.full.pdf>
- ⁸⁶. Heiny T. Miotto O. Srinivasan K. Khan A. Zhang G. et al. Evolutionarily Conserved Protein Sequences of Influenza A Viruses, Avian and Human, as Vaccine Targets School of Medicine, National University of Singapore [Internet]. 2007 [citado marz 10 2019]; 11: 1-13 . Disponible en: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0001190>

- ⁸⁷. Meneses L. Cuesta S. Determinación Computacional de la Afinidad y Eficiencia de Enlace de Antinflamatorios No Esteroides Inhibidores de la Ciclooxygenasa-2 Rev Universidad Católica de Ecuador Quito. [Internet]. 2015 [citado mar 30 2019]; 17–25. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/315761334_Determinacion_Computacional_de_la_Afinidad_y_Eficiencia_de_Enlace_de_Antinflamatorios_No_Esteroides_Inhibidores_de_la_Ciclooxygenasa-2
- ⁸⁸. Raymond C. Williams C. Química general 7ma. [Internet]. México. Editorial Mexicana, Reg. Num 736; 2002 [revisado 2002; citado 12 febrero 2019] Disponible en: <http://clea.edu.mx/biblioteca/Quimica%20General%20-%207ma%20Edicion%20-%20Raymond%20Chang.pdf>
- ⁸⁹. Fundamentos de Química Orgánica. Tema 8 Esteroquímica [Internet] [Actualizado 2005; citado 28 mar 2019]. Disponible en: <http://www.sinorg.uji.es/Docencia/FUNDOO/TEMA8FQO.pdf>
- ⁹⁰. Carrillo R. Zavaleta M. Bustos. , Álvarez H. Carrillo M, Carrillo Córdova C. La importancia de los parámetros farmacocinéticos y farmacodinámicos en la prescripción de antibióticos. Scielo. [Internet]. 2013 [citado mar 30 2019]; 56(3) 5–12. Disponible en: <http://www.scielo.org.mx/pdf/facmed/v56n3/v56n3a2.pdf>
- ⁹¹. Teoría del enlace químico Gua.org, Simoza L. [Internet] [Actualizado 2006; citado 28 mar 2019]. Disponible en: <https://guao.org/sites/default/files/biblioteca/Teor%C3%ADa%20del%20Enlace%20Qu%C3%A9mico.pdf>
- ⁹². Sugiyama, K. et Al. Crystal Structure of RNA polymerase PB1-PB2 subunits from Influenza A Virus . W.W. PDB [Internet] [citado 28 mar 2019]. Disponible en: https://files.rcsb.org/pub/pdb/validation_reports/zt/2ztt/2ztt_full_validation.pdf
- ⁹³. Kumar, G. et Al. 2009 H1N1 PA endonuclease domain. W.W. PDB [Internet] [citado 28 mar 2019]. Disponible en: https://files.rcsb.org/pub/pdb/validation_reports/de/5des/5des_full_validation.pdf
- ⁹⁴. Qiu, Het Al. W.W. PDB [Internet] [citado 28 mar 2019]. Disponible en: http://files.rcsb.org/pub/pdb/validation_reports/j2/4j2r/4j2r_full_validation.pdf
- ⁹⁵. MeSH Base de datos [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US). 2003 Abril- [citado 2017 julio 31]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/FLU/Database/nph-select.cgi>
- ⁹⁶. Cañedo R. Arencibia R. Bioinformática: en busca de los secretos moleculares de la vida. Scielo. [Internet]. 2005 [citado mar 30 2019]; 12(6) 5–12. Disponible en: <http://scielo.sld.cu/pdf/aci/v12n6/aci02604.pdf>

- ⁹⁷ Marti A. Turjanski A. La bioinformática estructural o la realidad virtual de los medicamentos. Quimica viva. [Internet].2009 [citado jun 06 2019]; 1 25–42. Disponible en: <http://scielo.sld.cu/pdf/aci/v12n6/aci02604.pdf>
- ⁹⁸ Venkataraman S. Prasad L. Ramasamy S. RNA Dependent RNA Polymerases: Insights from Structure, Function and Evolution. MDPI. [Internet].2018 [citado jun 06 2019]; 10(76) 2–23. Disponible en: <https://pdfs.semanticscholar.org/29e0/4dcc6922db1bc675af62c7839b6cb5adef43.pdf>

8. ANEXOS

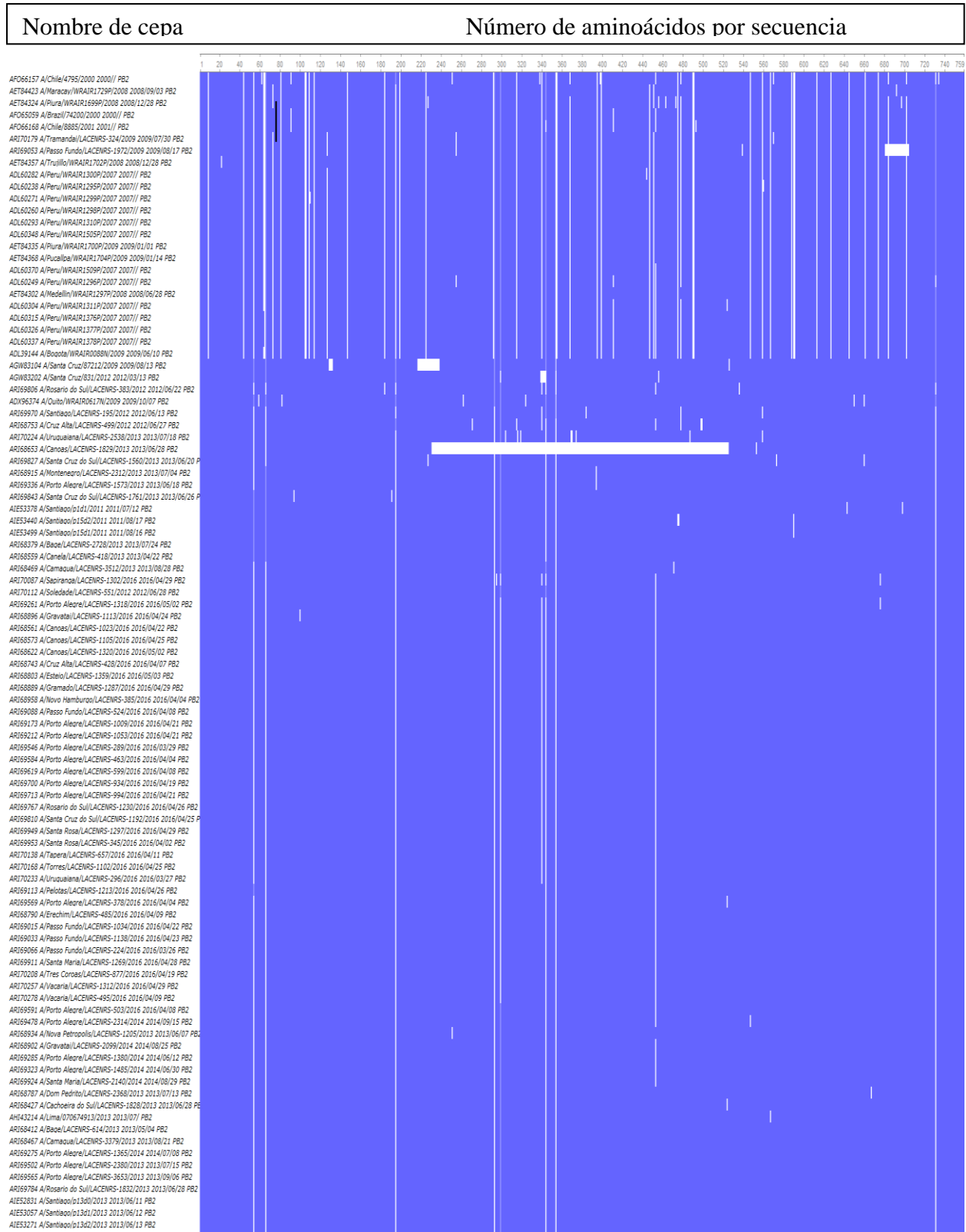
Anexo 1. Porcentaje de conservación de secuencias de aminoácidos de la proteína PB2 del virus de la Influenza A (H1N1).

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25
M	E	R	I	K	E	L	R	D	L	M	S	Q	S	R	T	R	E	I	L	T	K	T	T	Y
26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50
D	H	M	A	I	I	K	K	Y	T	S	G	R	Q	E	K	N	P	A	L	R	M	K	W	M
51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75
M	A	M	R	Y	P	I	T	A	D	K	R	I	M	D	M	I	P	E	R	N	E	Q	G	Q
76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
T	L	W	S	K	T	N	D	A	G	S	D	R	V	M	V	S	P	L	A	V	T	W	W	N
101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120	121	122	123	124	125
R	N	G	P	T	T	S	T	V	H	Y	P	K	V	Y	K	T	Y	F	E	K	Y	E	R	L
126	127	128	129	130	131	132	133	134	135	136	137	138	139	140	141	142	143	144	145	146	147	148	149	150
K	H	G	T	F	G	P	V	H	F	R	N	Q	V	K	I	R	R	R	V	D	T	N	P	G
151	152	153	154	155	156	157	158	159	160	161	162	163	164	165	166	167	168	169	170	171	172	173	174	175
H	A	D	L	S	A	K	E	A	Q	D	V	I	M	E	V	V	F	P	N	E	Y	G	A	R
176	177	178	179	180	181	182	183	184	185	186	187	188	189	190	191	192	193	194	195	196	197	198	199	200
I	L	T	S	E	S	Q	L	A	I	T	K	E	K	K	E	E	L	Q	D	C	K	I	A	P
201	202	203	204	205	206	207	208	209	210	211	212	213	214	215	216	217	218	219	220	221	222	223	224	225
L	M	V	A	Y	M	L	E	R	E	L	V	R	K	T	R	F	L	P	V	A	G	G	T	G
226	227	228	229	230	231	232	233	234	235	236	237	238	239	240	241	242	243	244	245	246	247	248	249	250
S	V	Y	I	E	V	L	H	L	T	Q	G	T	C	W	E	Q	M	Y	T	P	G	G	E	V
251	252	253	254	255	256	257	258	259	260	261	262	263	264	265	266	267	268	269	270	271	272	273	274	275
R	N	D	D	V	D	Q	S	L	I	I	A	A	R	N	I	V	R	R	A	A	Y	S	A	D
276	277	278	279	280	281	282	283	284	285	286	287	288	289	290	291	292	293	294	295	296	297	298	299	300
P	L	A	S	L	L	E	M	C	H	S	T	Q	I	G	G	V	R	M	V	D	I	L	R	Q
301	302	303	304	305	306	307	308	309	310	311	312	313	314	315	316	317	318	319	320	321	322	323	324	325
N	P	T	E	E	Q	A	V	D	I	C	K	A	A	I	G	L	R	I	S	S	S	F	S	F
326	327	328	329	330	331	332	333	334	335	336	337	338	339	340	341	342	343	344	345	346	347	348	349	350
G	G	F	T	F	K	R	T	S	G	S	S	V	K	K	E	E	E	V	L	T	G	N	L	Q
351	352	353	354	355	356	357	358	359	360	361	362	363	364	365	366	367	368	369	370	371	372	373	374	375
T	L	K	I	R	V	H	E	G	Y	E	E	F	T	M	V	G	R	R	A	T	A	I	L	R

376	377	378	379	380	381	382	383	384	385	386	387	388	389	390	391	392	393	394	395	396	397	398	399	400
K	A	T	R	R	L	I	Q	L	I	V	S	G	R	D	E	Q	S	I	A	E	A	I	I	V
401	402	403	404	405	406	407	408	409	410	411	412	413	414	415	416	417	418	419	420	421	422	423	424	425
A	M	V	F	S	Q	E	D	C	M	I	K	A	V	R	G	D	L	N	F	V	N	R	A	N
426	427	428	429	430	431	432	433	434	435	436	437	438	439	440	441	442	443	444	445	446	447	448	449	450
Q	R	L	N	P	M	H	Q	L	L	R	H	F	Q	K	D	A	K	V	L	F	Q	N	V	G
451	452	453	454	455	456	457	458	459	460	461	462	463	464	465	466	467	468	469	470	471	472	473	474	475
I	E	S	I	D	N	V	M	G	M	I	G	I	L	P	D	M	T	P	S	T	E	M	S	L
476	477	478	479	480	481	482	483	484	485	486	487	488	489	490	491	492	493	494	495	496	497	498	499	500
R	G	I	R	V	S	K	M	G	V	D	E	Y	S	S	T	E	R	V	V	V	S	I	D	R
501	502	503	504	505	506	507	508	509	510	511	512	513	514	515	516	517	518	519	520	521	522	523	524	525
F	L	R	V	R	D	Q	R	G	N	V	L	L	S	P	E	E	V	S	E	T	Q	G	T	E
526	527	528	529	530	531	532	533	534	535	536	537	538	539	540	541	542	543	544	545	546	547	548	549	550
K	L	T	I	T	Y	S	S	S	M	M	W	E	I	N	G	P	E	S	V	L	V	N	T	Y
551	552	553	554	555	556	557	558	559	560	561	562	563	564	565	566	567	568	569	570	571	572	573	574	575
Q	W	I	I	R	N	W	E	I	V	K	I	Q	W	S	Q	D	P	T	M	L	Y	N	K	M
576	577	578	579	580	581	582	583	584	585	586	587	588	589	590	591	592	593	594	595	596	597	598	599	600
E	F	E	P	F	Q	S	L	V	P	K	A	T	R	S	R	Y	S	G	F	V	R	T	L	F
601	602	603	604	605	606	607	608	609	610	611	612	613	614	615	616	617	618	619	620	621	622	623	624	625
Q	Q	M	R	D	V	L	G	T	F	D	T	V	Q	I	I	K	L	L	P	F	A	A	A	P
626	627	628	629	630	631	632	633	634	635	636	637	638	639	640	641	642	643	644	645	646	647	648	649	650
P	E	Q	S	R	M	Q	F	S	S	L	T	V	N	V	R	G	S	G	L	R	I	L	V	R
651	652	653	654	655	656	657	658	659	660	661	662	663	664	665	666	667	668	669	670	671	672	673	674	675
G	N	S	P	V	F	N	Y	N	K	A	T	K	R	L	T	V	L	G	K	D	A	G	A	L
676	677	678	679	680	681	682	683	684	685	686	687	688	689	690	691	692	693	694	695	696	697	698	699	700
T	E	D	P	D	E	G	T	S	G	V	E	S	A	V	L	R	G	F	L	I	L	G	K	E
701	702	703	704	705	706	707	708	709	710	711	712	713	714	715	716	717	718	719	720	721	722	723	724	725
D	K	R	Y	G	P	A	L	S	I	N	E	L	S	N	L	A	K	G	E	K	A	N	V	L
726	727	728	729	730	731	732	733	734	735	736	737	738	739	740	741	742	743	744	745	746	747	748	749	750
I	G	Q	G	D	V	V	L	V	M	K	R	K	R	D	S	S	I	L	T	D	S	Q	T	A
751	752	753	754	755	756	757	758	759																
T	K	R	I	R	M	A	I	N																

Color rojo: Secuencias altamente conservadas (95% - 100%). Color amarillo: Secuencias conservadas (80% - 95%). Color verde: Secuencias variables (30% - 80%). Color gris: Secuencias altamente variables (0% - 30%)^{76,80}

Tabla 4. Alineación de los aminoácidos de la proteína PB2 del virus de la Influenza A (H1N1).



AIE53103 A/SantaCruz/1862/2013 2013/06/21 PB2
AIE53035 A/SantaCruz/2040/2013 2013/06/20 PB2
AIE53316 A/SantaCruz/1011/2013 2013/06/21 PB2
AIE53305 A/SantaCruz/2002/2013 2013/06/22 PB2
AIE52967 A/SantaCruz/2540/2013 2013/07/08 PB2
AIE52852 A/SantaCruz/2543/2013 2013/07/09 PB2
ARI70321 A/Venancio Aires/LACENRS-1862/2013 2013/07/01 PB2
AIE53460 A/SantaCruz/1361/2011 2011/08/22 PB2
AIE53498 A/SantaCruz/1362/2011 2011/08/23 PB2
AIE53515 A/SantaCruz/1365/2011 2011/08/26 PB2
ADU59776 A/Argentina/MNRG102/2010 2010/01/15 PB2
AGW83114 A/Santa Cruz/995/2010 2010/09/21 PB2
AHC58478 A/Peru/PER045/2011 2011/12/01 PB2
ARI70435 A/Jacuarao/LACENRS-881/2011 2011/07/14 PB2
AIE53153 A/SantaCruz/2161/2011 2011/08/01 PB2
AIE53230 A/SantaCruz/2162/2011 2011/08/02 PB2
AIE53262 A/SantaCruz/2163/2011 2011/08/03 PB2
AIE53517 A/SantaCruz/1061/2011 2011/08/20 PB2
AIE53361 A/SantaCruz/2002/2011 2011/08/02 PB2
AIE53350 A/SantaCruz/2003/2011 2011/08/03 PB2
AIE53339 A/SantaCruz/2005/2011 2011/08/05 PB2
AIE53410 A/SantaCruz/941/2011 2011/08/22 PB2
AIE53421 A/SantaCruz/943/2011 2011/08/25 PB2
AIE53471 A/SantaCruz/945/2011 2011/08/27 PB2
AIE53412 A/SantaCruz/1941/2011 2011/07/19 PB2
AR69788 A/Rosario do Sul/LACENRS-2110/2009 2009/08/20 PB2
AGW83125 A/Santa Cruz/2164/2009 2009/07/01 PB2
ARI66690 A/Cruz Alta/LACENRS-129/2012 2012/05/28 PB2
AHH98690 A/Lima/INS3 671/2012 2012/02/01 PB2
ARI70032 A/Sao Francisco de Paula/LACENRS-1089/2012 2012/07/01 PB2
ARI70044 A/Sao Gabriel/LACENRS-1085/2012 2012/07/10 PB2
ARI70266 A/Viamonte/LACENRS-874/2012 2012/07/06 PB2
ARI70070 A/Sao Gabriel/LACENRS-1609/2012 2012/07/23 PB2
ARI70080 A/Sao Jose do Inhecora/LACENRS-2082/2012 2012/07/27 PB2
ARI68769 A/Cruz Alta/LACENRS-893/2012 2012/07/06 PB2
ARI69070 A/Passo Fundo/LACENRS-2459/2013 2013/07/14 PB2
ARI68544 A/Canela/LACENRS-1704/2012 2012/07/20 PB2
ARI68684 A/Caxias do Sul/LACENRS-1186/2011 2011/08/31 PB2
AGW83180 A/Santa Cruz/941/2012 2012/03/15 PB2
AGW83191 A/Santa Cruz/524/2012 2012/12/12 PB2
ARI69517 A/Porto Alegre/LACENRS-2577/2012 2012/08/08 PB2
ARI69460 A/Porto Alegre/LACENRS-2274/2012 2012/07/27 PB2
ARI68694 A/Chuvisca/LACENRS-287/2011 2011/06/16 PB2
ARI69488 A/Porto Alegre/LACENRS-2357/2012 2012/07/30 PB2
ARI69653 A/Porto Alegre/LACENRS-830/2011 2011/07/13 PB2
ARI69753 A/Rolante/LACENRS-2641/2012 2012/08/10 PB2
AGW83290 A/Santa Cruz/2093/2011 2011/10/31 PB2
ARI68441 A/Cachoeira/LACENRS-1083/2012 2012/07/10 PB2
ARI68450 A/Cabatao/LACENRS-903/2012 2012/07/08 PB2
ARI68485 A/Camaqua/LACENRS-623/2011 2011/07/01 PB2
ARI68764 A/Cruz Alta/LACENRS-892/2012 2012/07/06 PB2
ARI68845 A/Flores da Cunha/LACENRS-713/2011 2011/07/07 PB2
ARI68978 A/Osorio/LACENRS-2158/2012 2012/07/26 PB2
ARI69149 A/Pelotas/LACENRS-604/2011 2011/06/30 PB2
ARI69161 A/Pelotas/LACENRS-694/2011 2011/07/07 PB2
ARI69244 A/Porto Alegre/LACENRS-1292/2011 2011/08/05 PB2
ARI69383 A/Porto Alegre/LACENRS-1820/2012 2012/07/23 PB2
ARI69572 A/Porto Alegre/LACENRS-908/2012 2012/07/06 PB2
ARI69736 A/Rio Grande/LACENRS-2092/2013 2013/07/05 PB2
AGW83224 A/Santa Cruz/0181/2011 2011/09/30 PB2
AGW83225 A/Santa Cruz/0223/2011 2011/10/17 PB2
AGW83213 A/Santa Cruz/111/2012 2012/03/08 PB2
AGW83237 A/Santa Cruz/963/2011 2011/10/14 PB2
AGW83279 A/Santa Cruz/7941/2011 2011/09/29 PB2
AGW83246 A/Santa Cruz/7992/2011 2011/10/12 PB2
AGW83268 A/Santa Cruz/9083/2011 2011/10/31 PB2
ARI69997 A/Santo Antonio da Patrulha/LACENRS-2621/2012 2012/07/23 PB2
ARI70193 A/Tres Correas/LACENRS-1810/2012 2012/07/23 PB2
ARI70290 A/Vacaria/LACENRS-967/2012 2012/07/06 PB2
ARI70281 A/Vera Cruz/LACENRS-2842/2012 2012/08/23 PB2
ARI70333 A/Viamonte/LACENRS-1400/2011 2011/08/22 PB2
ARI69101 A/Pelotas/LACENRS-1188/2011 2011/08/01 PB2
AFK7906 A/Brazil/AVS08/2011 2011/06/09 PB2
AFK78037 A/Brazil/AVS11/2011 2011/06/07 PB2
ARI69880 A/Santa Cruz do Sul/LACENRS-691/2011 2011/06/29 PB2
ARI68815 A/Esteio/LACENRS-1519/2012 2012/07/17 PB2
AHH98766 A/Lima/INS3 676/2012 2012/07/17 PB2
ARI69895 A/Santa Cruz do Sul/LACENRS-700/2011 2011/07/01 PB2
AHH98755 A/Lima/INS3 677/2012 2012/07/04 PB2
AHH98777 A/Lima/INS3 680/2012 2012/07/12 PB2
AGW83136 A/Santa Cruz/005/2010 2010/08/17 PB2
ADO12492 A/Chile/3375/2009 2009/07/01 PB2
ADO12542 A/Chile/3766/2009 2009/07/06 PB2
AFK7866 A/Brazil/AVS03/2009 2009/06/12 PB2
AFB70284 A/Argentina/9004/2009 2009/06/20 PB2
AFB70304 A/Argentina/9711/2009 2009/06/23 PB2
ADK96335 A/Bozota/WRAIR04407/2009 2009/10/06 PB2
ARI69352 A/Porto Alegre/LACENRS-1598/2009 2009/08/12 PB2
AFB70224 A/Argentina/8019/2009 2009/06/18 PB2
ADU00450 A/Argentina/08AR/2009 2009/07/21 PB2
ADU59794 A/Argentina/MNRG105/2009 2009/06/24 PB2
ADU59852 A/Argentina/MNRG14/2009 2009/05/27 PB2
ADK96354 A/Pura/WRAIR0309/2009 2009/07/13 PB2
ADK96944 A/Lima/WRAIR8511F/2009 2009/06/25 PB2
AE137863 A/Chile/6/2010 2010/05/11 PB2
ADK96295 A/Lima/WRAIR0285F/2009 2009/07/15 PB2
ADK96395 A/Lima/WRAIR0672F/2009 2009/07/19 PB2
ADK96814 A/Lima/WRAIR1688P/2009 2009/07/03 PB2
ADK96954 A/Lima/WRAIR848F/2009 2009/06/25 PB2
ADK97014 A/Trujillo/WRAIR0309F/2009 2009/06/24 PB2
ADK96325 A/Bozota/WRAIR0435T/2009 2009/09/11 PB2
ADK96974 A/Pura/WRAIR1694F/2009 2009/07/13 PB2
ADO12532 A/Chile/3760/2009 2009/07/06 PB2
ADO12452 A/Chile/3295/2009 2009/06/30 PB2
ADO12342 A/Chile/2851/2009 2009/06/20 PB2
ADO12372 A/Chile/2911/2009 2009/06/25 PB2
ADO12282 A/Chile/1599/2009 2009/06/15 PB2
ARI68303 A/Argentina/LACENRS-1453/2009 2009/08/12 PB2
ADO12302 A/Chile/3457/2009 2009/07/02 PB2
ADO12182 A/Chile/36/2009 2009/05/25 PB2
ADO12212 A/Chile/56/2009 2009/05/26 PB2
ADO12242 A/Chile/158/2009 2009/05/28 PB2
ADO12262 A/Chile/1586/2009 2009/06/13 PB2
ADO12272 A/Chile/1598/2009 2009/06/15 PB2
ADO12292 A/Chile/1600/2009 2009/06/15 PB2
ADO12302 A/Chile/1603/2009 2009/06/15 PB2
ADO12312 A/Chile/1624/2009 2009/06/15 PB2
ADO12352 A/Chile/1601/2009 2009/06/29 PB2

AEI37802 A/Chile/19/2010/2010/07/01 PB2
 AEK21495 A/Chile/15/2010/2010/01/ PB2
 AEK21445 A/Chile/54/2010/2010/08/11 PB2
 AFB70142 A/Argentina/13777/2009/2009/06/20 PB2
 AFB70314 A/Argentina/9394/2009/2009/06/23 PB2
 ARI70255 A/Sea Gabriel/LACENRS-1626/2009/2009/08/14 PB2
 ARI69438 A/Porto Alegre/LACENRS-2121/2009/2009/08/20 PB2
 AGW83158 A/Santa Cruz/46631/2009/2009/06/24 PB2
 AGW83147 A/Santa Cruz/94841/2009/2009/07/02 PB2
 ADK96874 A/Lima/WRAIR88939/2009/2009/07/01 PB2
 ARI70400 A/Iitu/LACENRS-2326/2009/2009/06/23 PB2
 ARI70389 A/Treilinha/LACENRS-1803/2009/2009/07/31 PB2
 AEI37872 A/Chile/15/2010/2010/06/22 PB2
 AEI37942 A/Chile/54/2010/2010/08/09 PB2
 AEK21465 A/Chile/94/2010/2010/08/20 PB2
 AFB70384 A/Argentina/9705/2009/2009/06/24 PB2
 AFK7896 A/Brazil/AV507/2009/2009/07/31 PB2
 ARI68825 A/Estrela/LACENRS-513/2009/2009/07/31 PB2
 AFB70344 A/Argentina/9579/2009/2009/06/24 PB2
 AFB70234 A/Argentina/8551/2009/2009/06/21 PB2
 AFB70214 A/Argentina/7980/2009/2009/06/17 PB2
 AFB70294 A/Argentina/9180/2009/2009/06/23 PB2
 ADU59888 A/Argentina/HWRG36/2009/2009/06/21 PB2
 ADU59937 A/Argentina/HWRG63/2009/2009/06/17 PB2
 ADU59945 A/Argentina/HWRG84/2009/2009/07/05 PB2
 AFK7886 A/Brazil/AV506/2009/2009/09/16 PB2
 ADK97004 A/Lima/WRAIR92029/2009/2009/07/03 PB2
 ARI69009 A/Palmitinho/LACENRS-2955/2009/2009/08/31 PB2
 ARI69136 A/Pelotas/LACENRS-3045/2009/2009/09/18 PB2
 ARI69547 A/Porto Alegre/LACENRS-3434/2009/2009/10/28 PB2
 ADK97025 A/Areouba/WRAIR99399/2009/2009/07/06 PB2
 ADJ00451 A/Argentina/07-09/9/2009/2009/05/30 PB2
 ADJ00449 A/Argentina/19527/2009/2009/06/15 PB2
 ADJ00448 A/Argentina/19618/2009/2009/06/12 PB2
 ADJ00447 A/Argentina/19656/2009/2009/06/18 PB2
 AFB70164 A/Argentina/7649/2009/2009/06/17 PB2
 AFB70174 A/Argentina/7785/2009/2009/06/17 PB2
 AFB70184 A/Argentina/7937/2009/2009/06/18 PB2
 AFB70194 A/Argentina/7953/2009/2009/06/19 PB2
 AFB70204 A/Argentina/7967/2009/2009/06/17 PB2
 AFB70244 A/Argentina/8574/2009/2009/06/21 PB2
 AFB70254 A/Argentina/8673/2009/2009/06/19 PB2
 AFB70264 A/Argentina/8989/2009/2009/06/21 PB2
 AFB70274 A/Argentina/8994/2009/2009/06/22 PB2
 AFB70304 A/Argentina/9333/2009/2009/06/23 PB2
 AFB70324 A/Argentina/9452/2009/2009/06/22 PB2
 AFB70334 A/Argentina/9576/2009/2009/06/24 PB2
 AFB70354 A/Argentina/9583/2009/2009/06/24 PB2
 AFB70364 A/Argentina/9588/2009/2009/06/24 PB2
 AFB70374 A/Argentina/9597/2009/2009/06/24 PB2
 AFB70404 A/Argentina/9721/2009/2009/06/23 PB2
 ADU59785 A/Argentina/HWRG104/2009/2009/06/19 PB2
 ADU59834 A/Argentina/HWRG106/2009/2009/06/27 PB2
 ADU59843 A/Argentina/HWRG107/2009/2009/07/02 PB2
 AD483577 A/Argentina/HWRG13/2009/2009/06/05 PB2
 ADU59858 A/Argentina/HWRG15/2009/2009/07/20 PB2
 ADU59864 A/Argentina/HWRG21/2009/2009/07/01 PB2
 ADU59870 A/Argentina/HWRG23/2009/2009/07/27 PB2
 AD483619 A/Argentina/HWRG3/2009/2009/06/18 PB2
 ADU59876 A/Argentina/HWRG32/2009/2009/06/22 PB2
 ADU59882 A/Argentina/HWRG33/2009/2009/06/24 PB2
 ADU59894 A/Argentina/HWRG40/2009/2009/06/24 PB2
 ADU59900 A/Argentina/HWRG45/2009/2009/06/16 PB2
 ADU59910 A/Argentina/HWRG5/2009/2009/06/22 PB2
 ADU59923 A/Argentina/HWRG8/2009/2009/06/11 PB2
 ADU59929 A/Argentina/HWRG82/2009/2009/07/22 PB2
 ACJ30070 A/Bozota/0466N/2009/2009/06/25 PB2
 ADK96315 A/Bozota/WRAIR0435N/2009/2009/09/11 PB2
 ADK96344 A/Bozota/WRAIR0442T/2009/2009/06/19 PB2
 AFK77875 A/Brazil/AV504/2009/2009/08/13 PB2
 AFK78196 A/Brazil/AV505/2009/2009/01/ PB2
 ARI68521 A/Camina dos Missoes/LACENRS-2862/2009/2009/09/09/ PB2
 AD012482 A/Chile/3369/2009/2009/07/01 PB2
 AD012522 A/Chile/3386/2009/2009/07/03 PB2
 ADK96804 A/Lima/WRAIR16879/2009/2009/06/27 PB2
 ADK96894 A/Lima/WRAIR16969/2009/2009/06/25 PB2
 ARI68926 A/Nonoai/LACENRS-714/2009/2009/08/05 PB2
 ARI68980 A/Osorio/LACENRS-2638/2009/2009/09/02 PB2
 ARI69122 A/Pelotas/LACENRS-1658/2009/2009/08/14 PB2
 ARI69365 A/Porto Alegre/LACENRS-1771/2009/2009/07/30 PB2
 ARI69377 A/Porto Alegre/LACENRS-1786/2009/2009/07/31 PB2
 ARI68181 A/Rio Grande/LACENRS-1406/2009/2009/08/10 PB2
 ARI69860 A/Santa Cruz do Sul/LACENRS-2013/2009/2009/08/17 P
 AGW83169 A/Santa Cruz/12541/2009/2009/07/01 PB2
 ARI69984 A/Santo Anelo/LACENRS-1537/2009/2009/08/13 PB2
 ARI69994 A/Santo Antonio de Patrulla/LACENRS-1649/2009/2009/09/09/ PB2
 ARI70147 A/Tenente Portela/LACENRS-2073/2009/2009/08/19 PB2
 ARI70160 A/Teutonia/LACENRS-711/2009/2009/08/05 PB2
 ARI70216 A/Triunfo/LACENRS-1611/2009/2009/08/14 PB2
 ARI70272 A/Vacaria/LACENRS-1720/2009/2009/08/13 PB2
 ARI70307 A/Venancio Aires/LACENRS-1539/2009/2009/08/13 PB2

Color Azul: Resíduos de aminoácidos conservados, Color blanco: Resíduos de aminoácidos variables y deleciones de la secuencia. ⁷⁶

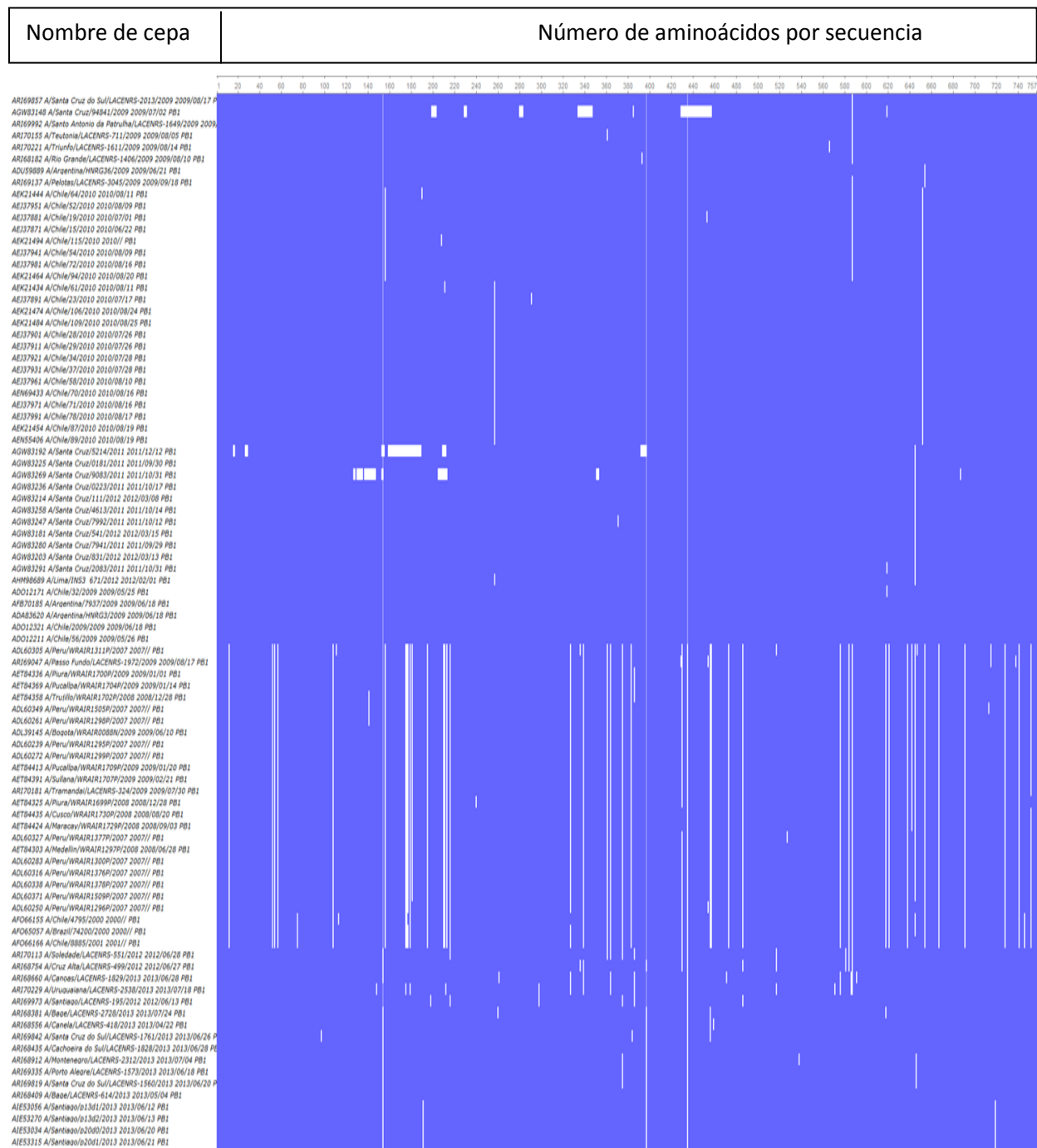
Anexo 2. Porcentaje de conservación de secuencias de aminoácidos de la proteína PB1 del virus de la Influenza A (H1N1)

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
M	D	V	N	P	T	L	L	F	L	K	I	P	A	Q	N	A	I	S	T	T	F	P	Y	T	G	D	P	P	Y
31	32	33	34	35	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61
S	H	G	T	G	G	Y	T	M	D	T	V	N	R	T	H	Q	Y	S	E	K	G	K	V	T	T	N	T	E	T
62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91
G	A	P	Q	L	N	P	I	D	G	P	L	P	E	D	N	E	P	S	G	Y	A	Q	T	D	C	V	L	E	A
92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120	121
M	A	F	L	E	E	S	H	P	G	I	F	E	N	S	C	L	E	T	M	E	V	Y	Q	Q	T	R	Y	D	K
122	123	124	125	126	127	128	129	130	131	132	133	134	135	136	137	138	139	140	141	142	143	144	145	146	147	148	149	150	151
L	T	Q	G	R	Q	T	Y	D	V	T	L	N	R	N	Q	P	A	A	T	A	L	A	N	T	I	E	Y	F	R
152	153	154	155	156	157	158	159	160	161	162	163	164	165	166	167	168	169	170	171	172	173	174	175	176	177	178	179	180	181
S	N	G	L	T	A	N	E	S	G	R	L	I	D	F	L	K	D	V	M	E	S	M	N	K	E	E	I	E	I
182	183	184	185	186	187	188	189	190	191	192	193	194	195	196	197	198	199	200	201	202	203	204	205	206	207	208	209	210	211
T	T	H	F	Q	R	K	R	R	Y	R	D	N	M	T	K	K	M	Y	T	Q	R	T	I	G	K	K	K	Q	R
212	213	214	215	216	217	218	219	220	221	222	223	224	225	226	227	228	229	230	231	232	233	234	235	236	237	238	239	240	241
L	N	K	R	G	Y	L	I	R	A	L	T	L	N	T	M	T	K	D	A	E	R	G	K	L	K	R	R	A	I
242	243	244	245	246	247	248	249	250	251	252	253	254	255	256	257	258	259	260	261	262	263	264	265	266	267	268	269	270	271
A	T	P	G	M	Q	I	R	G	F	V	Y	F	V	E	T	L	A	R	S	I	C	E	K	L	E	Q	S	G	L
272	273	274	275	276	277	278	279	280	281	282	283	284	285	286	287	288	289	290	291	292	293	294	295	296	297	298	299	300	301
P	V	G	G	N	E	K	K	A	K	L	A	N	Y	Y	R	K	M	M	T	N	S	Q	D	T	E	I	S	F	T
302	303	304	305	306	307	308	309	310	311	312	313	314	315	316	317	318	319	320	321	322	323	324	325	326	327	328	329	330	331
I	T	G	D	N	T	K	V	N	E	N	Q	N	P	R	M	F	L	A	M	I	T	Y	I	T	R	N	Q	P	E
332	333	334	335	336	337	338	339	340	341	342	343	344	345	346	347	348	349	350	351	352	353	354	355	356	357	358	359	360	361
V	F	R	N	I	L	S	M	A	P	I	M	F	S	N	K	M	A	R	L	G	K	G	Y	M	F	E	S	K	R

V	F	R	N	I	L	S	M	A	P	I	M	F	S	N	K	M	A	R	L	G	K	G	Y	M	F	E	S	K	R
362	363	364	365	366	367	368	369	370	371	372	373	374	375	376	377	378	379	380	381	382	383	384	385	386	387	388	389	390	391
M	K	I	R	T	Q	I	P	A	E	M	L	A	S	I	D	L	K	Y	F	N	E	S	T	K	K	K	I	E	K
392	393	394	395	396	397	398	399	400	401	402	403	404	405	406	407	408	409	410	411	412	413	414	415	416	417	418	419	420	421
I	R	P	L	L	I	D	G	T	A	S	L	S	P	G	M	M	M	G	M	F	N	M	L	S	T	V	L	G	V
422	423	424	425	426	427	428	429	430	431	432	433	434	435	436	437	438	439	440	441	442	443	444	445	446	447	448	449	450	451
S	I	L	N	L	G	Q	K	K	Y	T	K	T	I	Y	W	W	D	G	L	Q	S	S	D	D	F	A	L	I	V
452	453	454	455	456	457	458	459	460	461	462	463	464	465	466	467	468	469	470	471	472	473	474	475	476	477	478	479	480	481
N	A	P	N	H	E	G	I	Q	A	G	Y	D	R	F	Y	R	T	C	K	L	Y	G	I	N	M	S	K	K	K
482	483	484	485	486	487	488	489	490	491	492	493	494	495	496	497	498	499	500	501	502	503	504	505	506	507	508	509	510	511
S	Y	I	N	K	T	G	T	F	E	F	T	S	F	F	Y	R	Y	G	F	Y	A	N	F	S	M	E	L	P	S
512	513	514	515	516	517	518	519	520	521	522	523	524	525	526	527	528	529	530	531	532	533	534	535	536	537	538	539	540	541
F	G	Y	S	G	Y	N	E	S	A	D	M	S	I	G	Y	T	Y	I	K	N	N	M	I	N	N	D	L	G	P
542	543	544	545	546	547	548	549	550	551	552	553	554	555	556	557	558	559	560	561	562	563	564	565	566	567	568	569	570	571
A	T	A	Q	M	A	L	Q	L	F	I	K	D	Y	R	Y	T	Y	R	C	H	R	G	D	T	Q	I	Q	T	R
572	573	574	575	576	577	578	579	580	581	582	583	584	585	586	587	588	589	590	591	592	593	594	595	596	597	598	599	600	601
R	S	F	E	L	K	K	L	W	D	Q	T	Q	S	K	Y	G	L	L	Y	S	D	G	G	P	N	L	Y	N	I
602	603	604	605	606	607	608	609	610	611	612	613	614	615	616	617	618	619	620	621	622	623	624	625	626	627	628	629	630	631
R	N	L	H	I	P	E	Y	C	L	K	W	E	L	M	D	D	Y	R	G	R	L	C	N	P	L	N	P	F	
632	633	634	635	636	637	638	639	640	641	642	643	644	645	646	647	648	649	650	651	652	653	654	655	656	657	658	659	660	661
V	S	H	K	E	I	D	S	Y	N	N	A	Y	Y	M	P	A	H	G	P	A	K	S	M	E	Y	D	A	V	A
662	663	664	665	666	667	668	669	670	671	672	673	674	675	676	677	678	679	680	681	682	683	684	685	686	687	688	689	690	691
T	T	H	S	W	I	P	K	R	N	R	S	I	L	N	T	S	Q	R	G	I	L	E	D	E	Q	M	Y	Q	K
692	693	694	695	696	697	698	699	700	701	702	703	704	705	706	707	708	709	710	711	712	713	714	715	716	717	718	719	720	721
C	C	N	L	F	E	K	F	F	P	S	S	S	Y	R	R	P	Y	G	I	S	S	M	Y	E	A	M	Y	S	R
722	723	724	725	726	727	728	729	730	731	732	733	734	735	736	737	738	739	740	741	742	743	744	745	746	747	748	749	750	751
A	R	I	D	A	R	Y	D	F	E	S	G	R	I	K	K	E	E	F	S	E	I	M	K	I	C	S	T	I	E
752	753	754	755	756	757																								
E	L	R	R	Q	K																								

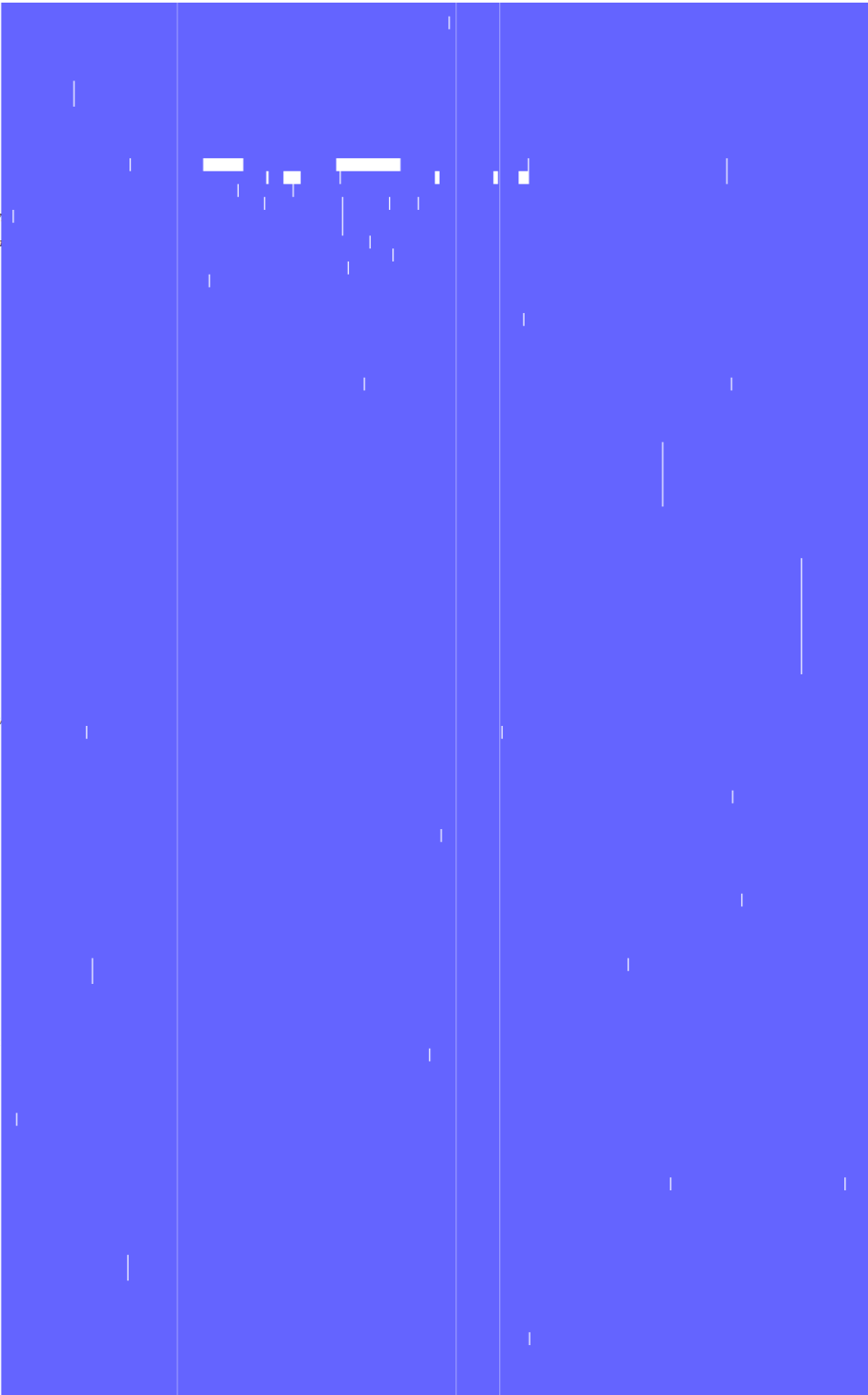
Color rojo: Secuencias altamente conservadas (95% - 100%). Color amarillo: Secuencias conservadas (80% - 95%). Color verde: Secuencias variables (30% - 80%). Color gris: Secuencias altamente variables (0% - 30%)^{76,80}

Tabla 6. Alineación de los aminoácidos de la proteína PB1 del virus de la Influenza A (H1N1)



ARI9933 A/Porto Alegre/LACENRS-13/2013 2013/06/10 PBI
ARI9919 A/Santa Cruz do Sul/LACENRS-1560/2013 2013/06/20 PBI
ARI6809 A/Vacaria/LACENRS-614/2013 2013/06/04 PBI
AIES3036 A/Santaque/1301/2013 2013/06/12 PBI
AIES3270 A/Santaque/1302/2013 2013/06/13 PBI
AIES3334 A/Santaque/1303/2013 2013/06/20 PBI
AIES3319 A/Santaque/1304/2013 2013/06/21 PBI
AIES3304 A/Santaque/1305/2013 2013/06/22 PBI
ARI6891 A/Divisa/LACENRS-2099/2014 2014/08/25 PBI
ARI6928 A/Porto Alegre/LACENRS-1380/2014 2014/06/13 PBI
ARI6473 A/Porto Alegre/LACENRS-2314/2014 2014/09/15 PBI
ARI6901 A/Passo Fundo/LACENRS-2242/2016 2016/03/26 PBI
ARI6479 A/Camaqua/LACENRS-351/2013 2013/08/28 PBI
AIES3377 A/Santaque/181/2011 2011/07/12 PBI
AIES3498 A/Santaque/161/2011 2011/08/16 PBI
ARI43215 A/Lima/0706/1913/2013 2013/07/07 PBI
AIES3241 A/Santaque/1805/2013 2013/06/19 PBI
AIES33048 A/Santaque/161/2011 2013/06/20 PBI
AIES3132 A/Santaque/1802/2013 2013/06/21 PBI
ARI70218 A/Vacaria/LACENRS-1312/2016 2016/04/29 PBI
ARI68481 A/Camaqua/LACENRS-3379/2013 2013/08/21 PBI
ARI68704 A/Cruz Alta/LACENRS-129/2012 2012/05/28 PBI
ARI68778 A/Chim Petropolis/LACENRS-2188/2013 2013/07/19 PBI
ARI68788 A/Trecho/LACENRS-485/2016 2016/04/09 PBI
ARI69029 A/Passo Fundo/LACENRS-1138/2016 2016/04/23 PBI
ARI69107 A/Petropolis/LACENRS-1213/2016 2016/04/26 PBI
ARI69327 A/Porto Alegre/LACENRS-1485/2014 2014/06/30 PBI
ARI69504 A/Porto Alegre/LACENRS-2380/2013 2013/07/15 PBI
ARI69582 A/Porto Alegre/LACENRS-3683/2013 2013/09/06 PBI
ARI69579 A/Porto Alegre/LACENRS-1202/2016 2016/04/04 PBI
ARI69583 A/Porto Alegre/LACENRS-503/2016 2016/04/08 PBI
ARI69703 A/Porto Alegre/LACENRS-994/2016 2016/04/19 PBI
ARI69915 A/Santa Maria/LACENRS-1268/2016 2016/04/28 PBI
ARI69919 A/Santa Maria/LACENRS-2140/2014 2014/08/28 PBI
AIES2998 A/Santaque/2540/2013 2013/07/08 PBI
AIES3281 A/Santaque/2543/2013 2013/07/09 PBI
ARI70170 A/Torre/LACENRS-1152/2016 2016/04/25 PBI
ARI70203 A/Tres Corais/LACENRS-877/2016 2016/04/19 PBI
ARI70282 A/Vacaria/LACENRS-493/2016 2016/04/09 PBI
ARI70312 A/Capivari/LACENRS-1842/2013 2013/07/01 PBI
ARI68938 A/Novo Petropolis/LACENRS-1205/2013 2013/06/07 PBI
ARI69779 A/Rosario do Sul/LACENRS-1832/2013 2013/06/28 PBI
ARI68616 A/Porto Alegre/LACENRS-989/2016 2016/04/08 PBI
ARI68571 A/Camaqua/LACENRS-1105/2016 2016/04/25 PBI
ARI68821 A/Camaqua/LACENRS-1320/2016 2016/05/02 PBI
ARI68805 A/Santa Cruz do Sul/LACENRS-1393/2016 2016/05/03 PBI
ARI69177 A/Porto Alegre/LACENRS-1009/2016 2016/04/21 PBI
ARI68740 A/Cruz Alta/LACENRS-426/2016 2016/04/07 PBI
ARI68879 A/Divisa/LACENRS-1287/2016 2016/04/29 PBI
ARI68917 A/Novo Hamburgo/LACENRS-385/2016 2016/04/04 PBI
ARI69081 A/Passo Fundo/LACENRS-524/2016 2016/04/08 PBI
ARI69251 A/Porto Alegre/LACENRS-1318/2016 2016/05/02 PBI
ARI69543 A/Porto Alegre/LACENRS-289/2016 2016/03/29 PBI
ARI69583 A/Porto Alegre/LACENRS-463/2016 2016/04/04 PBI
ARI69766 A/Rosario do Sul/LACENRS-1230/2016 2016/04/26 PBI
ARI68811 A/Santa Cruz do Sul/LACENRS-1192/2016 2016/04/28 PBI
ARI69952 A/Santa Rosa/LACENRS-1297/2016 2016/04/29 PBI
ARI69956 A/Santa Rosa/LACENRS-345/2016 2016/04/02 PBI
ARI70088 A/Santana/LACENRS-1302/2016 2016/04/29 PBI
ARI70140 A/Tapes/LACENRS-657/2016 2016/04/11 PBI
ARI70235 A/Uruquema/LACENRS-296/2016 2016/03/27 PBI
ARI69208 A/Porto Alegre/LACENRS-1053/2016 2016/04/21 PBI
ARI69062 A/Camaqua/LACENRS-1033/2016 2016/04/22 PBI
ARI69708 A/Porto Alegre/LACENRS-994/2016 2016/04/21 PBI
ARI69282 A/Porto Alegre/LACENRS-1385/2014 2014/07/08 PBI
ARI69013 A/Passo Fundo/LACENRS-1034/2016 2016/04/22 PBI
ARI68897 A/Divisa/LACENRS-1113/2016 2016/04/24 PBI
ARI68803 A/Rosario do Sul/LACENRS-383/2012 2012/06/22 PBI
ARI69754 A/Lima/193 677/2012 2012/07/04 PBI
ARI68810 A/Rosario/LACENRS-1518/2012 2012/07/17 PBI
ARI69271 A/Passo Fundo/LACENRS-2489/2013 2013/07/14 PBI
ARI69765 A/Lima/193 678/2012 2012/07/17 PBI
ARI69876 A/Lima/193 680/2012 2012/07/17 PBI
ARI68888 A/Santa Cruz do Sul/LACENRS-700/2011 2011/07/01 PBI
APK77905 A/Brazil/AV508/2011 2011/06/09 PBI
ARI68719 A/Santa Cruz do Sul/LACENRS-981/2011 2011/06/29 PBI
APK78036 A/Brazil/AV511/2011 2011/06/07 PBI
AIES3459 A/Santaque/1301/2011 2011/08/22 PBI
AIES3481 A/Santaque/1302/2011 2011/08/23 PBI
AIES3403 A/Santaque/1301/2011 2011/08/22 PBI
AIES3420 A/Santaque/1303/2011 2011/08/25 PBI
AIES3528 A/Santaque/1301/2011 2011/08/20 PBI
APK78477 A/Brazil/WRAR/2011 2011/12/01 PBI
ARI70434 A/Zucare/LACENRS-881/2011 2011/07/14 PBI
AIES3431 A/Santaque/1301/2011 2011/07/31 PBI
AIES3380 A/Santaque/1302/2011 2011/08/03 PBI
AIES3349 A/Santaque/1303/2011 2011/08/03 PBI
AIES3338 A/Santaque/1303/2011 2011/08/03 PBI
AIES3112 A/Santaque/1301/2011 2011/08/01 PBI
AIES3252 A/Santaque/1304/2011 2011/08/03 PBI
AIES3281 A/Santaque/1305/2011 2011/08/03 PBI
AIES3470 A/Santaque/1306/2011 2011/08/07 PBI
APK77881 A/Brazil/AV509/2009/08/13 PBI
ARI70399 A/Ita/LACENRS-2326/2009 2009/08/23 PBI
ARI69208 A/Novo/LACENRS-714/2009 2009/08/05 PBI
ARI69383 A/Porto Alegre/LACENRS-1786/2009 2009/07/31 PBI
ARI70148 A/Tenente Portela/LACENRS-2073/2009 2009/08/19 PBI
ARI70276 A/Vacaria/LACENRS-1720/2009 2009/08/13 PBI
ADO12511 A/Chim/1583/2009 2009/07/02 PBI
ADO12501 A/Chim/1582/2009 2009/07/02 PBI
ADO12531 A/Chim/1760/2009 2009/07/08 PBI
ADA7379 A/Chim/19/2009 2009/05/02 PBI
ADO12561 A/Chim/1905/2009 2009/07/08 PBI
ADO12591 A/Chim/1481/2009 2009/07/08 PBI
ADO12401 A/Chim/1482/2009 2009/07/10 PBI
ADO12621 A/Chim/440/2009 2009/07/11 PBI
ARI68765 A/Cruz Alta/LACENRS-892/2012 2012/07/08 PBI
ARI68771 A/Cruz Alta/LACENRS-893/2012 2012/07/08 PBI
ADO12201 A/Chim/42/2009 2009/05/25 PBI
APK78028 A/Argentina/NR04/2009 2009/06/20 PBI
ADU9938 A/Argentina/NR03/2009 2009/06/17 PBI
ADO12401 A/Chim/1056/2009 2009/06/24 PBI
ARI6886 A/Chim/LACENRS-2188/2012 2012/07/26 PBI
ADK96875 A/Pura/WRAR/1844/2009 2009/07/13 PBI
APK70345 A/Argentina/9579/2009 2009/06/24 PBI
APK78181 A/Brazil/AV509/2009/08/13 PBI
ADO12461 A/Chim/3349/2009 2009/07/01 PBI
ARI69520 A/Porto Alegre/LACENRS-2577/2012 2012/08/08 PBI
ARI69752 A/Rubiana/LACENRS-2441/2012 2012/08/10 PBI
APK70179 A/Argentina/778X/2009 2009/06/11 PBI
ADU99865 A/Argentina/NR02/2009 2009/07/01 PBI
ADO12231 A/Chim/180/2009 2009/05/29 PBI
ADO12631 A/Chim/1482/2009 2009/07/20 PBI
ARI70324 A/Veri Cruz/LACENRS-2842/2012 2012/08/23 PBI
APK70381 A/Argentina/9705/2009 2009/06/24 PBI
ADU0045 A/Argentina/07-0909/2009 2009/05/30 PBI
APK70245 A/Argentina/8574/2009 2009/06/21 PBI
APK77895 A/Brazil/AV507/2009 2009/07/31 PBI
ARI68832 A/Estrela/LACENRS-313/2009 2009/07/31 PBI
APK70313 A/Argentina/8574/2009 2009/06/24 PBI
APK77875 A/Brazil/AV504/2009 2009/08/13 PBI
ADO12451 A/Chim/1295/2009 2009/06/30 PBI
ARI69487 A/Porto Alegre/LACENRS-2357/2011 2012/07/30 PBI
ADU0042 A/Argentina/1956/2009 2009/06/18 PBI
ADO12619 A/Chim/1586/2009 2009/06/19 PBI
ADO12381 A/Chim/1586/2009 2009/06/13 PBI
ADO12381 A/Chim/36/2009 2009/05/25 PBI
ARI70048 A/Sao Gabriel/LACENRS-1085/2012 2012/07/10 PBI
ADO19809 A/Argentina/NR01/2009 2009/07/20 PBI
ADU19871 A/Argentina/NR03/2009 2009/07/21 PBI
ADU99930 A/Argentina/NR02/2009 2009/07/22 PBI
APK70295 A/Argentina/9180/2009 2009/06/23 PBI
ADK96316 A/Brazil/WRAR/435N/2009 2009/09/11 PBI

AR170075 A/Sao Gabriel/LACENRS-1809/2012 2012/07/23 PB1
 ADU59947 A/Argentina/HWRG84/2009 2009/07/05 PB1
 AFB70375 A/Argentina/9597/2009 2009/06/24 PB1
 AR168543 A/Canela/LACENRS-1704/2012 2012/07/20 PB1
 ADO12481 A/Chile/5369/2009 2009/07/01 PB1
 AR169680 A/Porto Alegre/LACENRS-908/2012 2012/07/06 PB1
 AFB70205 A/Argentina/7967/2009 2009/06/17 PB1
 ADO12581 A/Chile/4064/2009 2009/07/09 PB1
 AFB70365 A/Argentina/9588/2009 2009/06/24 PB1
 AR168447 A/Cabete/LACENRS-903/2012 2012/07/08 PB1
 ADO12471 A/Chile/3361/2009 2009/07/01 PB1
 AR169556 A/Porto Alegre/LACENRS-3434/2009 2009/10/28 PB1
 AGW83115 A/Santa Cruz/995/2010 2010/09/21 PB1
 AGW83137 A/Santa Cruz/005/2010 2010/08/19 PB1
 ADK96375 A/Cuito/WRAIR0617N/2009 2009/10/07 PB1
 AR169739 A/Rio Grande/LACENRS-2092/2013 2013/07/05 PB1
 AR170040 A/Sao Francisco de Paula/LACENRS-1089/2012 2012/07/07
 AR170356 A/Viamao/LACENRS-877/2012 2012/07/06 PB1
 AR168525 A/Camoinha das Missoes/LACENRS-2882/2009 2009/09/09
 AFB70355 A/Argentina/9583/2009 2009/06/24 PB1
 ACT22056 A/Castro/IXP/2009 2009/06/11 PB1
 ADK96805 A/Lima/WRAIR1687P/2009 2009/06/27 PB1
 AFB70215 A/Argentina/7980/2009 2009/06/17 PB1
 ADU59877 A/Argentina/HWRG32/2009 2009/06/22 PB1
 ACU30071 A/Bozota/046N/2009 2009/06/25 PB1
 ADU59835 A/Argentina/HWR106/2009 2009/06/27 PB1
 ADO12381 A/Chile/1598/2009 2009/06/15 PB1
 ADO12151 A/Chile/28/2009 2009/05/23 PB1
 AR170383 A/Lorelina/LACENRS-1803/2009 2009/07/31 PB1
 AR169458 A/Porto Alegre/LACENRS-2274/2012 2012/07/27 PB1
 AFB70225 A/Argentina/8019/2009 2009/06/18 PB1
 ADU59883 A/Argentina/HWRG33/2009 2009/06/24 PB1
 ADO12331 A/Chile/2239/2009 2009/06/19 PB1
 ADO12221 A/Chile/68/2009 2009/05/27 PB1
 ADU0453 A/Argentina/19618/2009 2009/06/12 PB1
 AFB70195 A/Argentina/7953/2009 2009/06/19 PB1
 AR169372 A/Porto Alegre/LACENRS-1771/2009 2009/07/30 PB1
 AGW83170 A/Santa Cruz/1254/2009 2009/07/01 PB1
 AR169982 A/Santa Anjela/LACENRS-1537/2009 2009/08/13 PB1
 AFB70395 A/Argentina/9711/2009 2009/06/23 PB1
 AR168678 A/Carias do Sul/LACENRS-1186/2011 2011/08/31 PB1
 ADO12491 A/Chile/5375/2009 2009/07/01 PB1
 ADM14773 A/Cuito/WRI589N/2009 2009/10/21 PB1
 AR168480 A/Camaqua/LACENRS-623/2011 2011/07/01 PB1
 AR168687 A/Chuvisca/LACENRS-287/2011 2011/06/16 PB1
 AR168844 A/Flores da Cunha/LACENRS-713/2011 2011/07/07 PB1
 AR169099 A/Pelotas/LACENRS-1188/2011 2011/08/01 PB1
 AR169157 A/Pelotas/LACENRS-604/2011 2011/06/30 PB1
 AR169165 A/Pelotas/LACENRS-694/2011 2011/07/07 PB1
 AR169240 A/Porto Alegre/LACENRS-1292/2011 2011/08/05 PB1
 AR169654 A/Porto Alegre/LACENRS-830/2011 2011/07/13 PB1
 AR170337 A/Viamao/LACENRS-1400/2011 2011/08/22 PB1
 AFB70405 A/Argentina/9711/2009 2009/06/23 PB1
 ADO12241 A/Chile/158/2009 2009/05/28 PB1
 ADO12521 A/Chile/5586/2009 2009/07/03 PB1
 AR170007 A/Santo Antonio da Patrulha/LACENRS-2621/2012 2012
 ADO12421 A/Chile/3220/2009 2009/06/30 PB1
 AFB70235 A/Argentina/8551/2009 2009/06/21 PB1
 ADU59895 A/Argentina/HWRG40/2009 2009/06/24 PB1
 ADO12351 A/Chile/2362/2009 2009/06/22 PB1
 ADO12231 A/Chile/95/2009 2009/05/27 PB1
 ADO12381 A/Chile/2994/2009 2009/06/26 PB1
 ADO12571 A/Chile/3935/2009 2009/07/07 PB1
 AR170191 A/Tres Corras/LACENRS-1810/2012 2012/07/23 PB1
 AR170285 A/Argentina/LACENRS-9670/2012 2012/07/06 PB1
 AFB70255 A/Argentina/8673/2009 2009/06/19 PB1
 ADU59901 A/Argentina/HWRG45/2009 2009/06/16 PB1
 ADO12341 A/Chile/2851/2009 2009/06/20 PB1
 ADK96895 A/Lima/WRAIR1696P/2009 2009/06/25 PB1
 ADO12361 A/Chile/2909/2009 2009/06/25 PB1
 AFB70275 A/Argentina/8994/2009 2009/06/22 PB1
 ADU59924 A/Argentina/HWRG8/2009 2009/06/11 PB1
 ADO12391 A/Chile/3019/2009 2009/06/26 PB1
 ADK97005 A/Lima/WRAIR9202P/2009 2009/07/03 PB1
 ADU59777 A/Argentina/HWRG102/2010 2010/01/15 PB1
 AR169437 A/Porto Alegre/LACENRS-2121/2009 2009/08/20 PB1
 AFB70165 A/Argentina/7649/2009 2009/06/17 PB1
 ADU59853 A/Argentina/HWRG4/2009 2009/06/27 PB1
 ADO12311 A/Chile/1634/2009 2009/06/15 PB1
 ADO12611 A/Chile/4257/2009 2009/07/13 PB1
 AR170308 A/Venancio Aires/LACENRS-1539/2009 2009/08/13 PB1
 AR168330 A/Alequre/LACENRS-1453/2009 2009/08/12 PB1
 AFB70265 A/Argentina/8989/2009 2009/06/21 PB1
 ADU59911 A/Argentina/HWRG5/2009 2009/06/22 PB1
 ADO12371 A/Chile/2911/2009 2009/06/25 PB1
 ADK96975 A/Lima/WRAIR8893P/2009 2009/07/01 PB1
 AR169348 A/Porto Alegre/LACENRS-1598/2009 2009/08/12 PB1
 AFB70325 A/Argentina/9452/2009 2009/06/22 PB1
 AKP77865 A/Brazil/AVS03/2009 2009/08/12 PB1
 ADO12441 A/Chile/2544/2009 2009/06/20 PB1
 AR169695 A/Porto Alegre/LACENRS-1820/2012 2012/07/23 PB1
 AE137861 A/Chile/6/2010 2010/05/11 PB1
 AFB70143 A/Argentina/13777/2009 2009/06/30 PB1
 AD483578 A/Argentina/HWRG13/2009 2009/06/05 PB1
 ADO12301 A/Chile/1603/2009 2009/06/15 PB1
 ADO12191 A/Chile/40/2009 2009/05/25 PB1
 ADK97015 A/Truillo/WRAIR8309P/2009 2009/06/24 PB1
 AR169792 A/Rosario do Sul/LACENRS-2110/2009 2009/08/20 PB1
 AR170064 A/Sao Gabriel/LACENRS-1626/2009 2009/08/14 PB1
 AFB70305 A/Argentina/9333/2009 2009/06/23 PB1
 ADK96326 A/Bozota/WRAIR0435T/2009 2009/09/11 PB1
 ADO12411 A/Chile/5123/2009 2009/06/26 PB1
 AR169903 A/Palmitinho/LACENRS-3955/2009 2009/08/31 PB1
 ADU04054 A/Argentina/15627/2009 2009/06/15 PB1
 AFB70315 A/Argentina/9384/2009 2009/06/23 PB1
 ADK96345 A/Bozota/WRAIR0442T/2009 2009/06/19 PB1
 ADO12431 A/Chile/5242/2009 2009/06/30 PB1
 AR169115 A/Pelotas/LACENRS-1658/2009 2009/08/14 PB1



Color Azul: Resíduos de aminoácidos conservados, Color blanco: Resíduos de aminoácidos variables y deleciones de la secuencia.

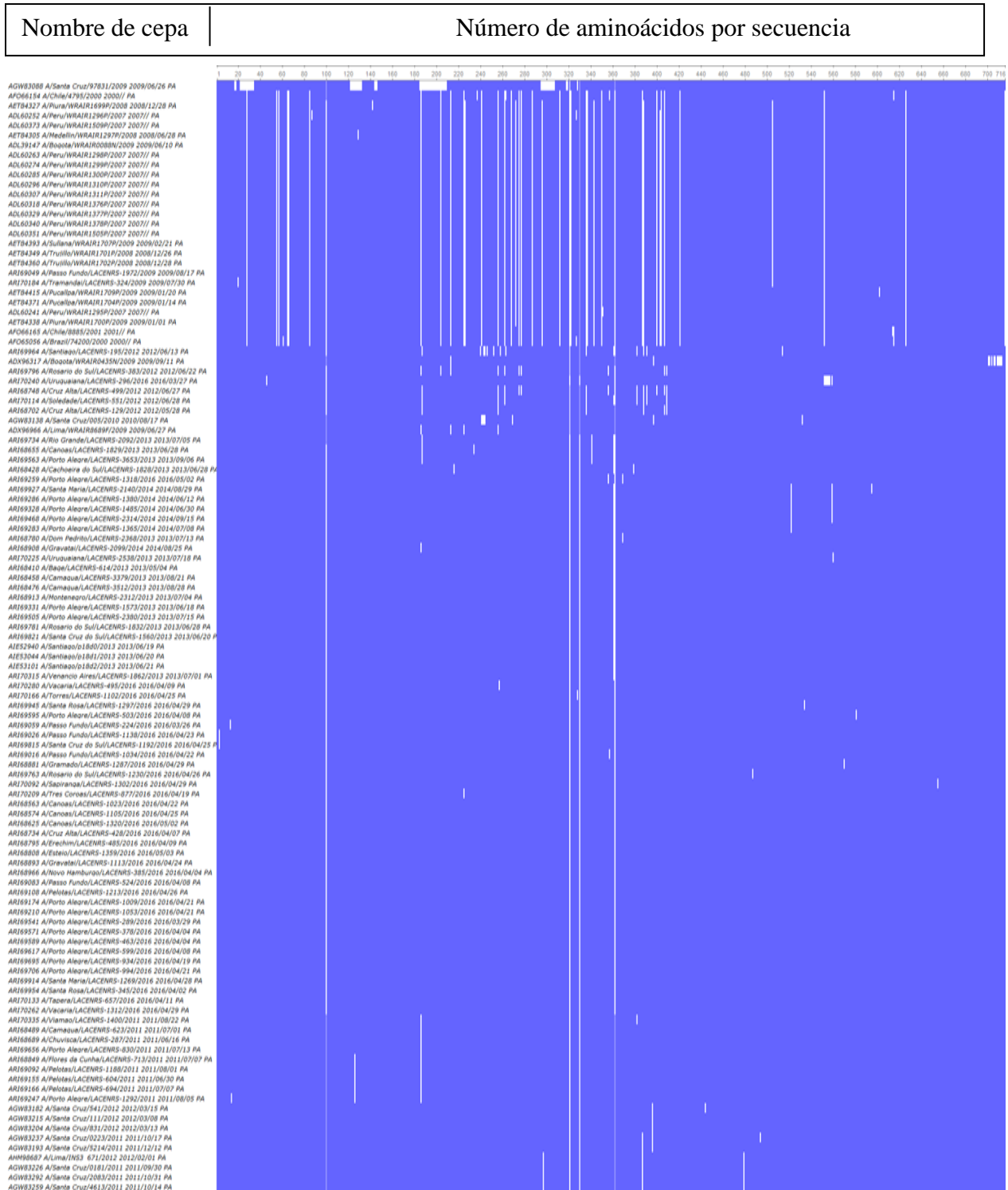
Anexo 3. Porcentaje de conservación de secuencias de aminoácidos de la proteína PA del virus de la Influenza A (H1N1).

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35
M	E	D	F	V	R	Q	Q	F	N	P	M	I	V	E	L	A	E	K	A	M	K	E	Y	G	E	D	P	K	I	E	T	N	K	F
36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70
A	A	I	C	T	H	L	E	V	C	F	M	Y	S	D	F	H	F	I	D	E	R	G	E	S	I	I	V	E	S	G	D	P	N	A
71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105
L	L	K	H	R	F	E	I	I	E	G	R	D	R	I	M	A	V	T	V	V	N	S	I	C	N	T	T	G	V	E	K	P	K	F
106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120	121	122	123	124	125	126	127	128	129	130	131	132	133	134	135	136	137	138	139	140
L	P	D	L	Y	D	Y	K	E	N	R	F	I	E	I	G	V	T	R	R	E	V	H	I	Y	Y	L	E	K	A	N	K	I	K	S
141	142	143	144	145	146	147	148	149	150	151	152	153	154	155	156	157	158	159	160	161	162	163	164	165	166	167	168	169	170	171	172	173	174	175
E	K	T	H	I	H	I	F	S	F	T	G	E	E	M	A	T	K	A	D	Y	T	L	D	E	E	S	R	A	R	I	K	T	R	L
176	177	178	179	180	181	182	183	184	185	186	187	188	189	190	191	192	193	194	195	196	197	198	199	200	201	202	203	204	205	206	207	208	209	210
F	T	I	R	Q	E	M	A	S	R	S	L	V	D	S	F	R	Q	S	E	R	G	E	E	T	I	E	E	K	F	E	I	T	G	T
211	212	213	214	215	216	217	218	219	220	221	222	223	224	225	226	227	228	229	230	231	232	233	234	235	236	237	238	239	240	241	242	243	244	245
M	R	K	L	A	D	Q	S	L	P	P	N	F	S	S	L	E	N	F	R	A	Y	V	D	G	F	E	P	N	G	C	I	E	G	K
246	247	248	249	250	251	252	253	254	255	256	257	258	259	260	261	262	263	264	265	266	267	268	269	270	271	272	273	274	275	276	277	278	279	280
L	S	Q	M	S	K	E	V	N	A	K	I	E	P	F	L	R	T	T	P	R	P	L	R	L	P	D	G	P	L	C	H	Q	R	S
281	282	283	284	285	286	287	288	289	290	291	292	293	294	295	296	297	298	299	300	301	302	303	304	305	306	307	308	309	310	311	312	313	314	315
K	F	L	L	M	D	A	L	K	L	S	I	E	D	P	S	H	E	G	E	G	I	P	L	Y	D	A	I	K	C	M	K	T	F	F
316	317	318	319	320	321	322	323	324	325	326	327	328	329	330	331	332	333	334	335	336	337	338	339	340	341	342	343	344	345	346	347	348	349	350
G	W	K	E	P	N	I	V	K	P	H	E	K	G	I	N	P	N	Y	L	M	A	V	K	Q	V	L	A	E	L	Q	D	I	E	N
351	352	353	354	355	356	357	358	359	360	361	362	363	364	365	366	367	368	369	370	371	372	373	374	375	376	377	378	379	380	381	382	383	384	385

E	E	K	I	P	R	T	K	N	M	K	R	T	S	Q	L	K	W	A	L	G	E	N	M	A	P	E	K	V	D	F	D	D	C	K	
386	387	388	389	390	391	392	393	394	395	396	397	398	399	400	401	402	403	404	405	406	407	408	409	410	411	412	413	414	415	416	417	418	419	420	
D	V	G	D	L	K	Q	Y	D	S	D	E	P	E	P	R	S	L	A	S	W	V	Q	N	E	F	N	K	A	C	E	L	T	D	S	
421	422	423	424	425	426	427	428	429	430	431	432	433	434	435	436	437	438	439	440	441	442	443	444	445	446	447	448	449	450	451	452	453	454	455	
S	V	I	E	L	D	E	I	G	E	D	V	A	P	I	E	H	I	A	S	M	R	R	N	Y	F	T	A	E	V	S	H	C	R	A	
456	457	458	459	460	461	462	463	464	465	466	467	468	469	470	471	472	473	474	475	476	477	478	479	480	481	482	483	484	485	486	487	488	489	490	
T	E	Y	I	M	K	G	V	Y	I	N	T	A	L	L	N	A	S	C	A	A	M	D	D	F	Q	L	I	P	M	I	S	K	C	R	
491	492	493	494	495	496	497	498	499	500	501	502	503	504	505	506	507	508	509	510	511	512	513	514	515	516	517	518	519	520	521	522	523	524	525	
T	K	E	G	R	R	K	T	N	L	Y	G	F	I	I	K	G	R	S	H	L	R	N	D	T	D	V	V	N	F	V	S	M	E	F	
526	527	528	529	530	531	532	533	534	535	536	537	538	539	540	541	542	543	544	545	546	547	548	549	550	551	552	553	554	555	556	557	558	559	560	
S	L	T	D	P	R	L	E	P	H	K	W	E	K	Y	C	V	L	E	I	G	D	M	L	L	R	T	A	I	G	Q	V	S	R	P	
561	562	563	564	565	566	567	568	569	570	571	572	573	574	575	576	577	578	579	580	581	582	583	584	585	586	587	588	589	590	591	592	593	594	595	
M	F	L	Y	V	R	T	N	G	T	S	K	I	K	M	K	W	G	M	E	M	R	R	C	L	L	Q	S	L	Q	Q	I	E	S	M	
596	597	598	599	600	601	602	603	604	605	606	607	608	609	610	611	612	613	614	615	616	617	618	619	620	621	622	623	624	625	626	627	628	629	630	
I	E	A	E	S	S	V	K	E	K	D	M	T	K	E	F	F	E	N	K	S	E	T	W	P	I	G	E	S	P	R	G	V	E	E	
631	632	633	634	635	636	637	638	639	640	641	642	643	644	645	646	647	648	649	650	651	652	653	654	655	656	657	658	659	660	661	662	663	664	665	
G	S	I	G	K	V	Q	R	T	L	L	A	K	S	V	F	N	S	L	Y	A	S	P	Q	L	E	G	F	S	A	E	S	R	K	L	
666	667	668	669	670	671	672	673	674	675	676	677	678	679	680	681	682	683	684	685	686	687	688	689	690	691	692	693	694	695	696	697	698	699	700	
L	L	I	V	Q	A	L	R	D	N	L	E	P	G	T	F	D	L	G	G	L	Y	E	A	I	E	E	C	L	I	N	D	P	W	Y	
701	702	703	704	705	706	707	708	709	710	711	712	713	714	715	716																				
L	L	N	A	S	W	F	N	S	F	L	T	H	A	L	K																				

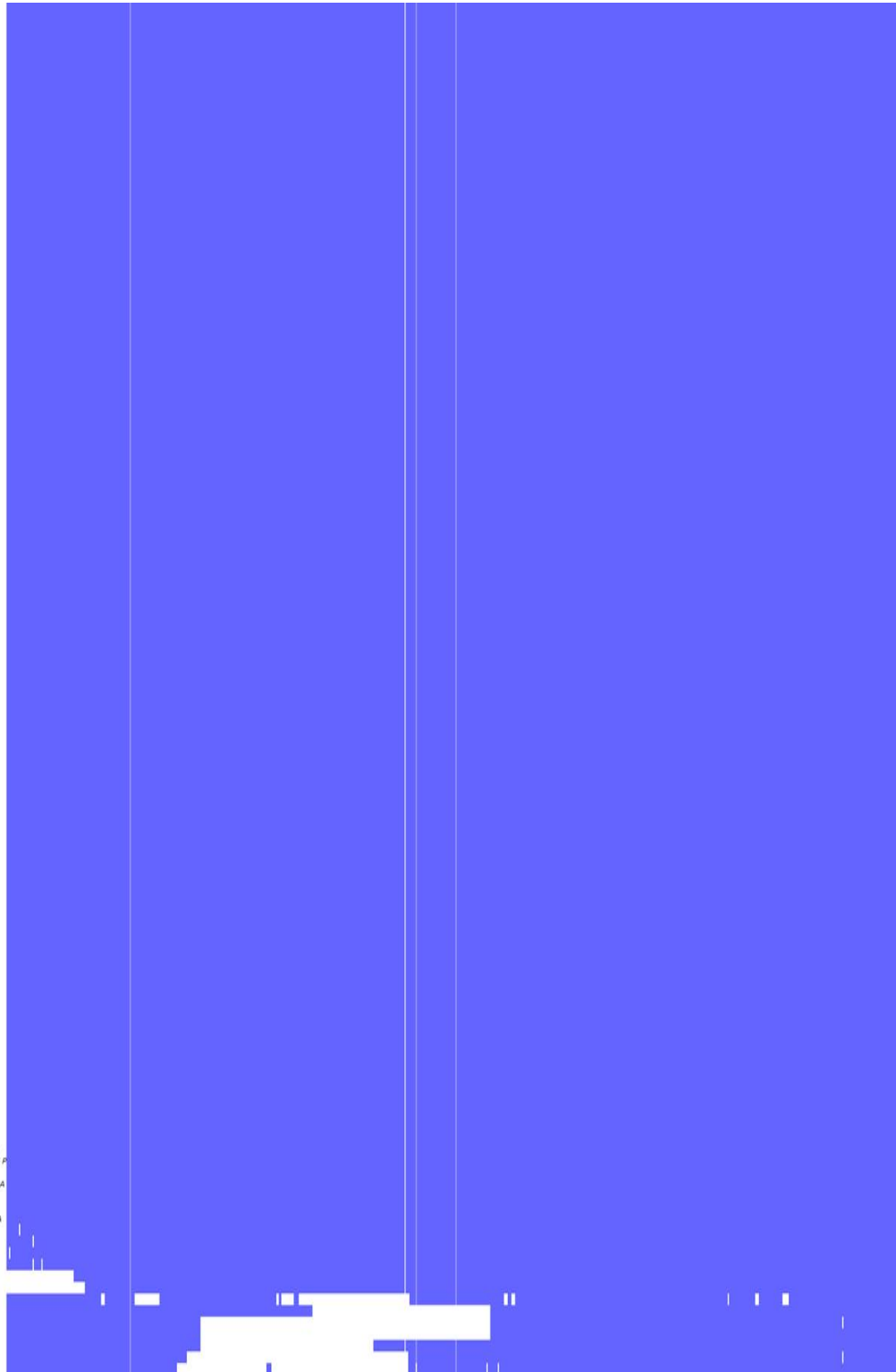
Color rojo: Secuencias altamente conservadas (95% - 100%). Color amarillo: Secuencias conservadas (80% - 95%). Color verde: Secuencias variables (30% - 80%). Color gris: Secuencias altamente variables (0% - 30%)
76,86

Tabla 8. Alineación de los aminoácidos de la proteína PA del virus de la Influenza A (H1N1).



AGW83292 A/Santa Cruz/2003/2011 2011/10/31 PA
AGW83259 A/Santa Cruz/4613/2011 2011/10/14 PA
AGW83201 A/Santa Cruz/794/2011 2011/09/29 PA
AGW83248 A/Santa Cruz/992/2011 2011/01/12 PA
AGW83270 A/Santa Cruz/9083/2011 2011/10/31 PA
ARI68448 A/Cabate/LACENRS-903/2012 2012/07/08 PA
ARI70067 A/Sao Gabriel/LACENRS-1809/2012 2012/07/23 PA
ARI70082 A/Sao Jose do Inhacore/LACENRS-2082/2012 2012/07/23 PA
ARI70196 A/Tres Coraas/LACENRS-1810/2012 2012/07/23 PA
ARI68773 A/Cruz Alta/LACENRS-893/2012 2012/07/06 PA
ARI69113 A/Porto Alegre/LACENRS-2597/2012 2012/08/08 PA
ARI69481 A/Porto Alegre/LACENRS-908/2012 2012/07/06 PA
ARI70000 A/Santo Antonio da Patrulha/LACENRS-2421/2012 2012/07/23 PA
ARI69396 A/Porto Alegre/LACENRS-1820/2012 2012/07/23 PA
ARI69754 A/Raiante/LACENRS-2641/2012 2012/08/10 PA
ARI68444 A/Cachoeirinha/LACENRS-1083/2012 2012/07/10 PA
ARI69461 A/Porto Alegre/LACENRS-2274/2012 2012/07/27 PA
ARI68530 A/Canela/LACENRS-1704/2012 2012/07/20 PA
ARI68676 A/Cariacis do Sul/LACENRS-1186/2011 2011/08/23 PA
ARI68760 A/Cruz Alta/LACENRS-892/2012 2012/07/06 PA
ARI68969 A/Casaris/LACENRS-2158/2012 2012/07/26 PA
ARI69481 A/Porto Alegre/LACENRS-2357/2012 2012/07/30 PA
ARI70037 A/Sao Francisco de Paula/LACENRS-1089/2012 2012/07/23 PA
ARI70051 A/Sao Gabriel/LACENRS-1085/2012 2012/07/10 PA
ARI70295 A/Vacaria/LACENRS-967/2012 2012/07/06 PA
ARI70229 A/Vera Cruz/LACENRS-2942/2012 2012/08/23 PA
ARI70360 A/Viamas/LACENRS-875/2012 2012/07/06 PA
AIES3376 A/Santiago/01/01/2011 2011/07/12 PA
AIES3497 A/Santiago/01/01/2011 2011/08/16 PA
ARI63385 A/Baia/LACENRS-2728/2013 2013/07/24 PA
ARI68844 A/Santa Cruz do Sul/LACENRS-1761/2013 2013/06/26 PA
ARI68557 A/Canela/LACENRS-418/2013 2013/04/22 PA
AHH9874 A/Lima/INSS 660/2012 2012/07/12 PA
AHH9875 A/Lima/INSS 677/2012 2012/07/04 PA
ARI69075 A/Passo Fundo/LACENRS-3459/2013 2013/07/14 PA
AIES3230 A/Santiago/01/360/2013 2013/06/11 PA
AIES3055 A/Santiago/01/361/2013 2013/06/12 PA
AIES3269 A/Santiago/01/362/2013 2013/06/13 PA
AIES3033 A/Santiago/02/040/2013 2013/06/20 PA
AIES3314 A/Santiago/02/011/2013 2013/06/21 PA
AIES3303 A/Santiago/02/050/2013 2013/06/22 PA
AIES2985 A/Santiago/02/368/2013 2013/07/08 PA
AIES2850 A/Santiago/02/583/2013 2013/07/09 PA
ARI68819 A/Estrela/LACENRS-1519/2012 2012/07/17 PA
AHH43216 A/Lima/070874913/2013 2013/07/17 PA
AHH98763 A/Lima/INSS 678/2012 2012/07/17 PA
ARI68935 A/Novo Petropolis/LACENRS-1205/2013 2013/06/07 PA
APK79904 A/Brazil/AVS08/2011 2011/06/09 PA
APK78035 A/Brazil/AVS11/2011 2011/06/07 PA
ARI68882 A/Santa Cruz do Sul/LACENRS-681/2011 2011/06/29 PA
ARI69695 A/Santa Cruz do Sul/LACENRS-700/2011 2011/07/01 PA
AIES3458 A/Santiago/01/361/2011 2011/08/22 PA
AIES3486 A/Santiago/01/362/2011 2011/08/23 PA
AIES3515 A/Santiago/01/365/2011 2011/08/26 PA
ACV77572 A/Le Paz/WR0967/2009 2009/06/22 PA
AGW83116 A/Santa Cruz/999/2010 2010/09/21 PA
APB70326 A/Santiago/045/2009 2009/06/22 PA
ADX96327 A/Basta/WRAIR04357/2009 2009/09/11 PA
ADX96377 A/Cuito/WRAIR04679/2009 2009/10/07 PA
AIES3430 A/Santiago/01/941/2011 2011/07/31 PA
AIES3151 A/Santiago/02/161/2011 2011/08/01 PA
AIES3228 A/Santiago/02/162/2011 2011/08/02 PA
AIES3280 A/Santiago/02/163/2011 2011/08/03 PA
AIE37860 A/Chile/2010 2010/05/11 PA
AIES3469 A/Santiago/09/05/2011 2011/08/27 PA
ARI70428 A/Jaquarao/LACENRS-081/2011 2011/07/14 PA
AHC58495 A/Peru/PER045/2011 2011/12/01 PA
AIES3359 A/Santiago/02/042/2011 2011/08/02 PA
AIES3348 A/Santiago/02/053/2011 2011/08/03 PA
AIES3537 A/Santiago/02/055/2011 2011/08/05 PA
AIES3408 A/Santiago/06/1/2011 2011/08/22 PA
AIES3419 A/Santiago/09/03/2011 2011/08/25 PA
ARI69434 A/Porto Alegre/LACENRS-2112/2009 2009/08/20 PA
AGW83127 A/Santa Cruz/21841/2009 2009/07/01 PA
AGW83160 A/Santa Cruz/46631/2009 2009/06/24 PA
AGW83149 A/Santa Cruz/94841/2009 2009/07/02 PA
ADO12160 A/Chile/31/2009 2009/05/25 PA
ADO12170 A/Chile/32/2009 2009/05/25 PA
AENS5405 A/Chile/09/2010 2010/08/19 PA
ADN14274 A/Cuito/WRAIR589/2009 2009/10/21 PA
ADN97017 A/Tuillio/WRAIR04987/2009 2009/06/24 PA
ARI70056 A/Sao Gabriel/LACENRS-1626/2009 2009/08/14 PA
ARI69554 A/Porto Alegre/LACENRS-3434/2009 2009/10/28 PA
ARI69370 A/Porto Alegre/LACENRS-1771/2009 2009/07/30 PA
ARI69118 A/Pelotas/LACENRS-1658/2009 2009/08/14 PA
ARI69929 A/Nonoai/LACENRS-714/2009 2009/08/05 PA
ADN96006 A/Lima/WRAIR16879/2009 2009/06/27 PA
ADO12280 A/Chile/4064/2009 2009/07/09 PA
ADO12440 A/Chile/3244/2009 2009/06/30 PA
ADO12450 A/Chile/3295/2009 2009/06/30 PA
ADO12460 A/Chile/3348/2009 2009/07/01 PA
ADO12180 A/Chile/36/2009 2009/05/25 PA
ADO12570 A/Chile/3935/2009 2009/07/07 PA
ADO12610 A/Chile/4257/2009 2009/07/13 PA
ADU99886 A/Argentina/HWR021/2009 2009/07/01 PA
ADU99860 A/Argentina/HWR015/2009 2009/07/20 PA
ADU99854 A/Argentina/HWR014/2009 2009/05/27 PA
AFB70356 A/Argentina/9583/2009 2009/06/24 PA
AFB70336 A/Argentina/9576/2009 2009/06/24 PA
AFB70346 A/Argentina/9579/2009 2009/06/24 PA
AFB70366 A/Argentina/9588/2009 2009/06/24 PA
AFB70236 A/Argentina/8551/2009 2009/06/21 PA
AFB70216 A/Argentina/7960/2009 2009/06/17 PA
AFB70206 A/Argentina/7967/2009 2009/06/17 PA
AIE33780 A/Chile/15/2010 2010/06/22 PA
ARI68327 A/Alequre/LACENRS-1453/2009 2009/08/12 PA
ADO12280 A/Chile/1599/2009 2009/06/15 PA
ADO12350 A/Chile/2362/2009 2009/06/22 PA
ADO12190 A/Chile/40/2009 2009/05/25 PA
ADO12200 A/Chile/42/2009 2009/05/25 PA
ADU00460 A/Argentina/0848/2009 2009/07/21 PA
AFB70276 A/Argentina/9597/2009 2009/06/24 PA
APK7864 A/Brazil/AVS03/2009 2009/08/12 PA
AEA73778 A/Chile/19/2009 2009/05/22 PA
ADO12510 A/Chile/3553/2009 2009/07/02 PA
ADO12550 A/Chile/3819/2009 2009/07/06 PA
ARI69010 A/Palmitinho/LACENRS-2595/2009 2009/08/31 PA
AGW83171 A/Santa Cruz/12541/2009 2009/07/01 PA

 AFB70226 A/Argentina/8019/2009 2009/06/18 PA
 AFB70246 A/Argentina/8574/2009 2009/06/21 PA
 AFB70256 A/Argentina/8673/2009 2009/06/19 PA
 AFB70266 A/Argentina/8989/2009 2009/06/21 PA
 AFB70276 A/Argentina/8994/2009 2009/06/22 PA
 AFB70286 A/Argentina/9004/2009 2009/06/20 PA
 AFB70296 A/Argentina/9180/2009 2009/06/23 PA
 AFB70306 A/Argentina/9333/2009 2009/06/23 PA
 AFB70316 A/Argentina/9384/2009 2009/06/23 PA
 AFB70386 A/Argentina/9705/2009 2009/06/24 PA
 AFB70406 A/Argentina/9721/2009 2009/06/23 PA
 ADU59787 A/Argentina/HNRG104/2009 2009/06/19 PA
 ADU59627 A/Argentina/HNRG105/2009 2009/06/24 PA
 ADU59845 A/Argentina/HNRG107/2009 2009/07/02 PA
 ADA83579 A/Argentina/HNRG13/2009 2009/06/05 PA
 ADA83621 A/Argentina/HNRG3/2009 2009/06/18 PA
 ADU59878 A/Argentina/HNRG32/2009 2009/06/22 PA
 ADU59884 A/Argentina/HNRG33/2009 2009/06/24 PA
 ADU59890 A/Argentina/HNRG36/2009 2009/06/21 PA
 ADU59896 A/Argentina/HNRG40/2009 2009/06/24 PA
 ADU59902 A/Argentina/HNRG43/2009 2009/06/16 PA
 ADU59912 A/Argentina/HNRG5/2009 2009/06/22 PA
 ADU59925 A/Argentina/HNRG6/2009 2009/06/11 PA
 AGL10072 A/Bozota/0466N/2009 2009/06/25 PA
 ACY77553 A/Bozota/WRAIR000N/2009 2009/06/16 PA
 ADX96346 A/Bozota/WRAIR0442T/2009 2009/06/19 PA
 AFB77874 A/Brazil/AV504/2009 2009/08/13 PA
 AFB78194 A/Brazil/AV505/2009 2009/07/11 PA
 AFB77884 A/Brazil/AV506/2009 2009/09/14 PA
 AFB77894 A/Brazil/AV507/2009 2009/07/31 PA
 AEK21473 A/Chile/106/2010 2010/08/24 PA
 AEK21483 A/Chile/109/2010 2010/08/25 PA
 AEK21493 A/Chile/115/2010 2010/07/10 PA
 ADO12240 A/Chile/1158/2009 2009/05/28 PA
 ADO12260 A/Chile/11586/2009 2009/06/13 PA
 ADO12270 A/Chile/11598/2009 2009/06/15 PA
 ADO12290 A/Chile/1600/2009 2009/06/15 PA
 ADO12300 A/Chile/1603/2009 2009/06/15 PA
 ADO12310 A/Chile/1624/2009 2009/06/15 PA
 ADO12250 A/Chile/180/2009 2009/05/29 PA
 AEI37880 A/Chile/19/2010 2010/07/01 PA
 ADO12320 A/Chile/2009/2009 2009/06/18 PA
 ADO12330 A/Chile/2339/2009 2009/06/19 PA
 AEI37890 A/Chile/23/2010 2010/07/17 PA
 ADO12150 A/Chile/28/2009 2009/05/23 PA
 ADO12340 A/Chile/2851/2009 2009/06/20 PA
 AEI37910 A/Chile/29/2010 2010/07/28 PA
 ADO12360 A/Chile/2909/2009 2009/06/25 PA
 ADO12370 A/Chile/2911/2009 2009/06/25 PA
 ADO12380 A/Chile/2994/2009 2009/06/26 PA
 ADO12390 A/Chile/3018/2009 2009/06/26 PA
 ADO12400 A/Chile/3056/2009 2009/06/26 PA
 ADO12410 A/Chile/3123/2009 2009/06/26 PA
 ADO12420 A/Chile/3220/2009 2009/06/30 PA
 ADO12430 A/Chile/3242/2009 2009/06/30 PA
 ADO12470 A/Chile/3361/2009 2009/07/01 PA
 ADO12480 A/Chile/3369/2009 2009/07/01 PA
 AEI37920 A/Chile/34/2010 2010/07/28 PA
 ADO12500 A/Chile/3467/2009 2009/07/02 PA
 ADO12520 A/Chile/3586/2009 2009/07/03 PA
 AEI37930 A/Chile/37/2010 2010/07/28 PA
 ADO12530 A/Chile/3760/2009 2009/07/06 PA
 ADO12560 A/Chile/3905/2009 2009/07/07 PA
 ADO12590 A/Chile/4181/2009 2009/07/09 PA
 ADO12600 A/Chile/4182/2009 2009/07/10 PA
 ADO12620 A/Chile/4406/2009 2009/07/17 PA
 ADO12630 A/Chile/4438/2009 2009/07/20 PA
 AEI37950 A/Chile/52/2010 2010/08/09 PA
 AEI37940 A/Chile/54/2010 2010/08/09 PA
 ADO12110 A/Chile/56/2009 2009/05/26 PA
 AEI37960 A/Chile/58/2010 2010/08/10 PA
 AEK21433 A/Chile/61/2010 2010/08/11 PA
 AEK21443 A/Chile/64/2010 2010/08/11 PA
 AEI37970 A/Chile/71/2010 2010/08/16 PA
 AEI37980 A/Chile/72/2010 2010/08/16 PA
 AEI37990 A/Chile/79/2010 2010/08/17 PA
 AEK21453 A/Chile/87/2010 2010/08/19 PA
 ADO12220 A/Chile/88/2009 2009/05/27 PA
 AEK21463 A/Chile/94/2010 2010/08/20 PA
 ADO12230 A/Chile/95/2009 2009/05/27 PA
 AR16835 A/Itareira/LACENRS-213/2009 2009/07/31 PA
 AR170386 A/Itareira/LACENRS-1803/2009 2009/07/31 PA
 AR170390 A/Itaiti/LACENRS-2326/2009 2009/08/23 PA
 ADX96297 A/Lima/WRAIR0285F/2009 2009/07/15 PA
 ADX96356 A/Lima/WRAIR0319F/2009 2009/07/08 PA
 ADX96397 A/Lima/WRAIR0373F/2009 2009/07/19 PA
 ADX96816 A/Lima/WRAIR1688P/2009 2009/07/03 PA
 ADX96896 A/Lima/WRAIR1896P/2009 2009/06/25 PA
 ADX96946 A/Lima/WRAIR851F/2009 2009/06/25 PA
 ADX96976 A/Lima/WRAIR8893F/2009 2009/07/01 PA
 ADX9706 A/Lima/WRAIR0320F/2009 2009/07/03 PA
 AR169807 A/Orosio/LACENRS-2648/2009 2009/09/02 PA
 AR169146 A/Pelotas/LACENRS-3045/2009 2009/09/18 PA
 ADX96366 A/Pura/WRAIR0603F/2009 2009/07/13 PA
 ADX96876 A/Pura/WRAIR1694P/2009 2009/07/13 PA
 AR169349 A/Porto Alegre/LACENRS-1590/2009 2009/08/12 PA
 AR169381 A/Porto Alegre/LACENRS-1790/2009 2009/07/31 PA
 AR168186 A/Rio Grande/LACENRS-1406/2009 2009/08/10 PA
 AR169789 A/Rosario do Sul/LACENRS-2110/2009 2009/08/20 PA
 AR169855 A/Santa Cruz do Sul/LACENRS-2013/2009 2009/08/17 PA
 AR169976 A/Santo Anselmo/LACENRS-1537/2009 2009/08/13 PA
 AR170153 A/Teresita Pariba/LACENRS-2072/2009 2009/08/19 PA
 AR170162 A/Tautoma/LACENRS-711/2009 2009/08/05 PA
 AR170268 A/Vacaria/LACENRS-1720/2009 2009/08/13 PA
 AR170309 A/Venancio Aires/LACENRS-1539/2009 2009/08/13 PA
 AEI37900 A/Chile/28/2010 2010/07/26 PA
 ADU59778 A/Argentina/HNRG102/2010 2010/03/15 PA
 ADX97027 A/Arceutha/WRAIR9939F/2009 2009/07/06 PA
 ADX96407 A/Lima/WRAIR0681F/2009 2009/07/17 PA
 AFB70144 A/Argentina/13777/2009 2009/06/30 PA
 AFB70396 A/Argentina/9711/2009 2009/06/23 PA
 AGH83105 A/Santa Cruz/8721/2009 2009/08/13 PA
 ADU59836 A/Argentina/HNRG104/2009 2009/06/24 PA
 ADU59872 A/Argentina/HNRG23/2009 2009/07/27 PA
 ADU59948 A/Argentina/HNRG84/2009 2009/07/05 PA
 ADU59939 A/Argentina/HNRG3/2009 2009/06/17 PA
 ADU59931 A/Argentina/HNRG82/2009 2009/07/22 PA
 AGH83096 A/Santa Cruz/5873/2011 2011/10/31 PA



Color Azul: Residuos de aminoácidos conservados, Color blanco: Residuos de aminoácidos variables y deleciones de la secuencia. ⁷⁶