

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



“ANÁLISIS IN SILICO DE LA SUBUNIDAD HA1 DE LA  
HEMAGLUTININA DEL VIRUS DE LA INFLUENZA A(H1N1)PDM09  
DE CEPAS CIRCULANTES EN UNA POBLACIÓN MEXICANA”

Por

CAROLINA PALESTINO FRIAS

Como requisito parcial para obtener el Grado de  
MAESTRO EN CIENCIAS CON  
ORIENTACIÓN EN INMUNOBIOLOGÍA

2025

ANÁLISIS IN SILICO DE LA SUBUNIDAD HA1 DE LA HEMAGLUTININA DEL VIRUS DE LA INFLUENZA A(H1N1)PDM09 DE CEPAS CIRCULANTES EN UNA POBLACIÓN MEXICANA.

**Comité de Tesis**

**Dr. Juan Francisco Contreras Cordero**  
Presidente

**Dra. Mayra Alejandra Gómez Govea**  
Secretario

**Dra. Licet Villarreal Treviño**  
Vocal

**Dr. Pablo Zapata Benavides**  
Vocal

**Dra. Brenda Leticia Escobedo Guajardo**  
Vocal

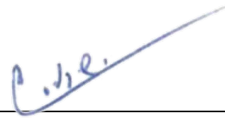
**Dra. Katiushka Arévalo Niño**  
Subdirectora de Posgrado



SUBDIRECCIÓN  
DE POSGRADO

ANÁLISIS IN SILICO DE LA SUBUNIDAD HA1 DE LA HEMAGLUTININA DEL VIRUS DE LA INFLUENZA A(H1N1)PDM09 DE CEPAS CIRCULANTES EN UNA POBLACIÓN MEXICANA.

**Dirección de Tesis**



---

**Dr. Juan Francisco Contreras Cordero**

Director de Tesis



---

**Dra. Brenda Leticia Escobedo Guajardo**

Director Externo

## **AVISO DERECHOS DE AUTOR**

Derechos reservados ©

**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material en esta tesis está protegido, el uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material contenido que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde se obtuvo mencionando al autor o autores.

Se agradece de manera especial a la Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación (SECIHTI).



*Agradezco al Laboratorio de Inmunología y Virología de la Universidad Autónoma de Nuevo León y al Laboratorio de Investigación Molecular de Enfermedades del Centro de Investigación Biomédica del Noreste del Instituto Mexicano del Seguro Social por brindarme el apoyo económico y la infraestructura para realizar este proyecto.*

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue realizado gracias al favor de dios, que día con día me permitió continuar con mis estudios y las actividades necesarias para concluir con esta etapa de mi crecimiento profesional. Además de esto, quisiera mencionar el gran apoyo que recibí de mi padre y de mi madre, que constantemente confiaron en mí y me guiaron a formar una vida de bien. A mis tías y tíos que han sido como segundos padres que han abierto su corazón para compartir su cariño conmigo. De manera especial quiero agradecer a mi hermana Anabel, que ha sido mi compañera durante muchos años y espero podamos seguir compartiendo nuestros pequeños y grandes logros.

Agradezco a la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, y en particular quisiera agradecer el apoyo de mi comité de tesis, al Doctor Carlos Eduardo Hernández Luna, a la Doctora Licet Villareal Treviño y al Doctor Pablo Zapata Benavides por ser mis profesores durante este posgrado y también enriquecer este trabajo con su apoyo y opiniones. Sobre todo al Doctor Juan Francisco Contreras Cordero, por siempre recibirme con la mejor disposición y su incontable apoyo durante estos años.

No obstante, también quisiera mencionar al Centro de Investigación Biomédica del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), por abrirme las puertas y permitir ser el lugar de mi desarrollo académico. Al Doctor Mario Bermudez por siempre inspirarnos a continuar cultivándonos tanto profesional como personalmente, a la Doctora Laura, por su disposición para ayudarnos siempre que necesitemos, a la Doctora Katia, por su gran apoyo desde que estaba en la licenciatura y de manera especial a la Doctora Brenda Leticia Escobedo Guajardo, por ser mi tutora estos últimos 3 años, por confiar en mí y apoyarme e impulsarme a llegar a nuevos alcances.

*“Dios no sólo creó los cielos y la tierra, sino que Él creó la base científica para que nosotros pudiéramos estudiar su trabajo”*

The Old Paths Archive

## ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	3
1. ANTECEDENTES	4
1.1 Virus de la influenza	4
1.2 Virus de influenza A	4
1.3 Patogenia	5
1.4 Hemaglutinina	6
1.5 Dominio de unión al receptor	7
1.6 Dominio de fusión	7
1.7 Impacto de mutaciones en la hemaglutinina viral	8
1.8 Caracterización genética del virus de la influenza	9
1.9 Efecto de la pandemia de COVID-19 en la circulación del virus de la influenza	10
2. JUSTIFICACIÓN	12
3. HIPÓTESIS	13
4. OBJETIVOS	14
4.1 OBJETIVO GENERAL	14
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
5. MATERIALES Y MÉTODOS	15
5.1 Diagnóstico de influenza A(H1N1)pdm09 por RT-PCR en tiempo real	15
5.2 Extracción de ARN	15
5.3 Reacción en Cadena de la Polimerasa- Retrotranscriptasa Multisegmento	15
5.4 Electroforesis en gel de agarosa	16
5.4.1 Preparación del búfer de carga	16
5.4.2 Preparación del búfer TBE	17
5.4.3 Preparación del marcador de peso molecular (MPM)	17
5.4.4 Preparación del gel de agarosa	17
5.4.5 Selección de muestras para análisis de subunidad HA1	17
5.4.6 PCR para segmento de ~ 300 pb de la subunidad HA1	18

5.4.7	Electroforesis de polimorfismos de conformación de cadena simple	18
5.4.8	Tinción con plata	19
5.4.9	Diseño de iniciadores	19
6.5	PCR para amplificar la HA1	21
6.6	Obtención del vector plasmídico con la secuencia HA1	21
6.6.1	Preparación de agar LB	21
6.6.2	Preparación de caldo LB	22
6.6.3	Subclonación en vector pCR 2.1 TOPO	22
6.6.4	Transformación de células competentes de E. coli DH5alpha	23
6.6.5	Aislamiento de clonas	23
6.6.6	Cultivo en caldo LB	24
6.6.7	Preservación en glicerol	24
6.6.8	Purificación por Minipreparación	24
7	RESULTADOS	26
7.1	Amplificación de segmentos génicos del IAV	26
7.2	Selección de muestras para secuenciación	26
7.3	Amplificación de la subunidad HA1 del gen de la Hemaglutinina del virus de influenza.	28
7.4	Caracterización genética de muestras de influenza	29
7.5	Análisis de la secuencia 1037.4	30
7.6	Modelo de las estructuras de las secuencias 1037.4 y MK630778.1	33
7.7	Análisis estructural y de características bioquímicas	34
7.8	Superposicionamiento de las secuencias 1037.4 y MK630778.1	39
8	DISCUSIÓN	47
9	CONCLUSIONES	51
10	PERSPECTIVAS	52
11	BIBLIOGRAFÍA	53
12	RESUMEN BIOGRÁFICO	62

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Principales pandemias provocadas por el virus de influenza a través de la historia.	5
Figura 2 .Números de acceso de NCBI utilizados para el diseño de iniciadores para la amplificación de la subunidad HA1.	20
Figura 3. Mapa del vector pCR 2.1-TOPO® de Invitrogen..	22
Figura 4. Muestras de Influenza de la temporada 2018-2019. .	26
Figura 5. Amplificación de fragmento de la subunidad HA1 del virus de la influenza de la temporada 2018-2019. P	27
Figura 6. Gel de poliacrilamida 6% de muestras de influenza de la temporada 2018-2019	28
Figura 7 Amplificación de la subunidad HA1 de muestras de influenza de la temporada 2018-2019.	28
Figura 8. Análisis de patrones obtenidos por la técnica SSCP en Gel de poliacrilamida 10% de muestras de influenza de la temporada 2018-2019.	29
Figura 9 . Aislamientos del candidato 1037 en medio con kanamicina para la selección de colonias..	30
Figura 10. Aislamiento del candidato 0386 utilizando kanamicina como medio de selección de colonias.	30
Figura 11. Secuencia 1037.4 correspondiente a la región codificante de la subunidad HA1.	31
Figura 12. Alineamiento de la región codificante de las secuencias MK630778.1 y 1037.4.	32
Figura 13. Alineamiento de la región codificante de las secuencias aminoacídicas MK630778.1 y 1037.4.	32
Figura 14.Región de sustitución de aminoácido en las secuencias aminoacídicas MK630778.1 y 1037.4.	33
Figura 15. Estructuras químicas de los aminoácidos presentes en la posición 202, de las secuencias MK630778.1 y 1037.4.	33
Figura 16. Valores de calidad del modelo generado para la estructura proteica de la secuencia MK630778.1	34
Figura 17. Valores de calidad del modelo generado para la estructura proteica de la	

secuencia 1037.4	34
Figura 18 . Modelo tridimensional de la secuencia MK630778.1 y regiones importantes de la proteína..	35
Figura 19. Modelo tridimensional de la secuencia 1037.4 y regiones importantes de la proteína.	36
Figura 20. Análisis de hidrofobicidad de las estructuras proteicas de las secuencias MK630778.1 y 1037.4.	37
Figura 21. Análisis de potencial eléctrico de las estructuras proteicas de las secuencias MK630778.1 y 1037.4	37
Figura 22. Análisis de Desorden de las estructuras proteicas de las secuencias MK630778.1 y 1037.4	38
Figura 23. Análisis de potencial óxido-reducción de las estructuras proteicas de las secuencias MK630778.1 y 1037.4	39
Figura 24. Superposicionamiento de las estructuras proteicas de las secuencias MK630778.1 y 1037.4	40
Figura 25. Molécula de ácido N-acetilneuramínico extraída de PubChem..	41
Figura 26. Selección del sitio de acoplamiento molecular en las estructuras proteicas de las secuencias MK630778.1 y 1037.4	41
Figura 27. Acoplamiento molecular de las estructuras proteicas de las secuencias MK630778.1 y 1037.4 y del ácido N-acetilneuramínico..	42
Figura 28. Visualización de la interacción proteína-ligando en la estructura de referencia.	43
Figura 29. Visualización de la interacción proteína-ligando en la estructura 1037.4..	44
Figura 30. Leyenda de los elementos visuales en LigPlus..	44
Figura 31. Secuencias de HA de diferentes países en el periodo de 2018-2019.	45
Figura 32. Árbol filogenético de secuencias de HA de diferentes continentes y las secuencias de referencia MK630778.1 y 1037.4	46

## INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Componentes de la mezcla de reacción para la retrotranscripción y amplificación del genoma viral.	16
Tabla 2. Iniciadores para amplificar segmento de la subunidad HA1.	18
Tabla 3. Iniciadores diseñados para amplificar la subunidad HA1 de la hemaglutinina del virus de la influenza A.	20
Tabla 4. Mezcla de reacción para amplificación de subunidad HA1.	21
Tabla 5. Reactivos para subclonación.	23

## LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

HA	Hemaglutinina
NA	Neuraminidasa
SSCP	Polimorfismo de conformación de Cadena Simple
IAV	Virus de Influenza A
MPM	Marcador de Peso Molecular
CTR	Muestra Control
NTC	Control Negativo
VIP	Virus de Influenza Porcina
M1	Proteína De Matriz
NP	Nucleocápside
RNP	Ribonucleoproteínas
RFLP	Polimorfismos De Longitud De Fragmentos De Restricción
SNP	Polimorfismos De Un Nucleótido
CIBIN	Centro De Investigación Biomédica Del Noreste
IMSS	Instituto Mexicano del Seguro Social
SMILES Molecular	Sistema Simplificado De Entrada De Línea De Entrada
PDB	Banco de datos de proteína

## RESUMEN

El virus de la influenza A es un virus con alta capacidad de mutación que año tras año ocasiona epidemias estacionales en México, por lo anterior, es importante realizar un análisis de regiones de sus proteínas de superficie para contribuir a la vigilancia que se mantiene sobre este tipo de virus con potencial pandémico. Una de las regiones de mayor interés en el virus de la influenza A es la hemaglutinina, proteína que está compuesta por dos subunidades denominadas HA1 y HA2. De estas subunidades, HA1 es de mayor importancia debido a su alta tasa de mutación que puede afectar tanto al sitio de unión al receptor (RBS) como a las regiones antigénicas presentes en esta proteína.

Durante la pandemia de Covid-19, los casos de influenza en México disminuyeron en comparación a los años anteriores debido a las medidas de higiene sanitaria aplicadas, no obstante, en años posteriores los casos de influenza A fueron en aumento, por lo que un análisis comparativo de las secuencias pre y pospandémicas de la hemaglutinina viral permitiría dilucidar los cambios y el impacto de los mismos tanto en su estructura como en la interacción de la hemaglutinina con el tracto respiratorio del hospedero humano.

En este estudio, se partió de un bloque de secuencias de hemaglutinina viral de la temporada de influenza 2018-2019 las cuales se analizaron a través de la técnica de Polimorfismo de Cadena Sencilla con el objetivo de visualizar patrones electroforéticos distintos que indicaran un posible cambio en la secuencia nucleotídica, el cual se encontró en el aminoácido 202 de la secuencia de la HA1, utilizando herramientas bioinformáticas se evaluó el impacto en las características físicas y químicas de la estructura proteica, donde se aprecia un cambio en la hidrofobicidad y en el potencial de óxido reducción. Igualmente, al realizar el superposicionamiento de las estructuras se observó que no hubo cambio estructural en la posición 202. Se realizó un análisis filogenético con el fin de relacionar secuencias de diferentes partes del mundo con la secuencia obtenida en este proyecto y correlacionar su evolución.

## ABSTRACT

The influenza A virus is highly mutable and causes seasonal epidemics in Mexico year after year. Therefore, it is important to analyze regions of its surface proteins to contribute to the ongoing surveillance of this type of virus with pandemic potential. One of the most interesting regions of the influenza A virus is the hemagglutinin, a protein composed of two subunits called HA1 and HA2. Of these subunits, HA1 is of greatest importance due to its high mutation rate, which can affect both the receptor-binding site (RBS) and the antigenic regions present in this protein. During the COVID-19 pandemic, influenza cases in Mexico decreased compared to previous years due to sanitary hygiene measures. However, in subsequent years, influenza A cases increased. Therefore, a comparative analysis of the pre- and post-pandemic sequences of viral hemagglutinin would help elucidate the changes and their impact on both its structure and its interaction with the human host's respiratory tract. In this study, a block of viral hemagglutinin sequences from the 2018-2019 influenza season were used, which were analyzed through the Single Strand Polymorphism technique with the aim of visualizing distinct electrophoretic patterns that indicated a possible change in the nucleotide sequence, which was found at amino acid 202 of the HA1 sequence, using bioinformatics tools, the impact on the physical and chemical characteristics of the protein structure was evaluated, where a change in hydrophobicity and redox potential is observed. Likewise, when superimposing the structures, it was observed that there was no structural change at position 202. A phylogenetic analysis was carried out in order to relate sequences from different parts of the world with the sequence obtained in this project and correlate their evolution.

## INTRODUCCIÓN

El virus de la influenza es un patógeno importante para la salud pública que ha afectado a la población mundial. Después de la pandemia de 1918 se registraron tres pandemias en los años 1957, 1968 y en el 2009. Una de las proteínas importantes del virus es la hemaglutinina (HA), que es un trímero compuesto por dos subunidades denominadas HA1 y HA2, que corresponden a la cabeza y tallo de la proteína respectivamente, ambas presentan características que le dan capacidad para infectar a la célula huésped y por consecuencia la adquisición de características patogénicas del virus (Kosik & Yewdell, 2019).

En lo particular, la subunidad HA1 presenta sitios de unión al receptor (RBS) y determinantes antigénicos importantes que se utilizan como blanco para el reconocimiento por anticuerpos generados durante la infección viral. Existe evidencia de que mutaciones en esta proteína provocan cambios en estas regiones que impactan en el reconocimiento celular, así como en los procesos de evasión de la respuesta inmune del hospedero (Tzarum *et al.*, 2015).

Una forma de poder analizar el impacto que las mutaciones en estos sitios puedan llegar a ocasionar es a través de análisis *in silico* donde se utiliza un conjunto de software y de herramientas bioinformáticas para predecir este posible impacto y por consecuencia, estudiar los cambios que adquieren a través de la circulación del virus de la influenza que año con año aparecen durante las temporadas de otoño e invierno. Además, con este tipo de análisis también se puede rastrear el origen de nuevas cepas y poder comprender su origen evolutivo para poder generar información que pueda ser utilizada en poder rastrear nuevas cepas que vayan apareciendo conforme a los años.

Por lo anterior en este trabajo se realizó un análisis *in silico* de la hemaglutinina del virus de la influenza A obtenidas de pacientes positivos de la temporada 2018-2019 y se comparó con las secuencias reportadas en la última temporada 2023-2024 con el objetivo de analizar la evolución de la hemaglutinina del virus de la influenza.

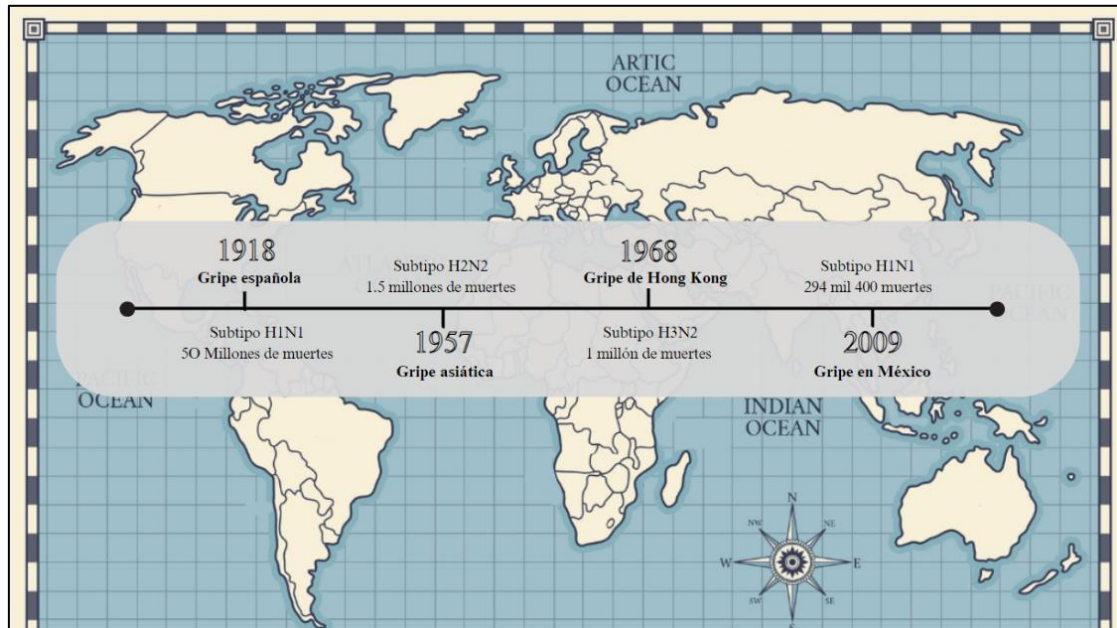
## 1. ANTECEDENTES

### 1.1 Virus de la influenza

El virus de influenza pertenece a la familia *Orthomyxoviridae*, de la cual se conocen los tipos A, B, C y D, siendo el tipo A y B aquellos con la capacidad de infectar seres humanos. De ellos, solo Influenza virus A es capaz de producir pandemias. Influenza virus A es un virus con un genoma segmentado en ocho fragmentos de ARN negativo, estos segmentos codifican para 12 proteínas (Willie M *et al.*, 2020). De ellos, los segmentos cuatro y seis codifican para la hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (NA) respectivamente, las cuales son glicoproteínas de superficie que se utilizan para subdividir en subtipos a los virus de la influenza A. para poder diferenciarlos se utilizan los diferentes subtipos de HA y NA siendo 19 subtipos de hemaglutinina y 11 para neuraminidasa (Wang y *et al.*, 2022).

### 1.2 Virus de influenza A

El virus de la influenza de tipo A, ha ocasionado diferentes pandemias a largo de la historia. En la pandemia de 1918 conocida como la fiebre española. El subtipo responsable fue H1N1, el cual causó más de 40 millones de muertes. Posteriormente aparecieron dos pandemias en el continente asiático en los años 1957 y 1968 con la aparición de los subtipos H2N2 y H3N2 respectivamente con aproximadamente un millón de muertes reportadas en cada una (Taubenberger J & Morens DM, 2020). La pandemia más reciente fue causada por el subtipo H1N1 en el 2009, la cual tuvo su origen en México. El virus responsable de esta pandemia fue de nuevo H1N1 y se le denominó A(H1N1)pdm09 lo cual hace alusión al virus de la influenza A subtipo H1N1 pandemia del 2009. Este subtipo presentó una menor letalidad que el H1N1 de 1918 (Hernández A & Alpuche A, 2020).



**Figura 1. Principales pandemias provocadas por el virus de influenza a través de la historia**  
Se muestran los datos del subtipo circulante por pandemia, además del estimado de fallecimientos estimados en cada una de ellas.

### 1.3 Patogenia

El virus de la influenza se transmite de persona a persona a través de gotitas exhaladas al hablar, toser o estornudar. Al ingresar el virus por la cavidad oral o nasal se establece una infección primaria en el tracto respiratorio superior por la adherencia del virus al epitelio respiratorio a través de la hemaglutinina presente en la envoltura fosfolipídica del virus (Hemaglutinina y Neuraminidasa). La interacción se da a través del reconocimiento de residuos de ácido siálico que se encuentra unido a glicoproteínas y glicolípidos en el epitelio respiratorio. Posterior a esta interacción, se forma un endosoma lo cual, por acción de la proteína M2 del virus que funciona como un canal iónico, baja el pH endosomal y estimula cambios conformacionales en la hemaglutinina exponiendo un péptido de fusión con el cual se inserta en la membrana endosomal. Esta activación libera el complejo ribonucleoproteico del virus al citoplasma celular para posteriormente ser transportado al núcleo a través de señales de localización nuclear. Una vez en el núcleo se lleva a cabo la transcripción y replicación del genoma viral. Las proteínas generadas junto con el nuevo genoma viral participan en la morfogénesis, maduración y liberación de los virus nuevamente formados (Carrada, 2011).

La detección de nuevos virus se puede realizar desde un día antes de la aparición de los primeros síntomas hasta por un período de siete días. Algunos de los signos y síntomas que se presentan en la influenza son: fiebre, tos, dolor de garganta, secreción, congestión nasal, dolor muscular, dolor de cabeza, fatiga y en ciertos casos se presenta diarrea y vómito (Arias, 2009). La infección puede ser asintomática, y los síntomas pueden ser leves, moderados o severos. Estos últimos pueden poner en riesgo la vida del paciente (Talledo y Zumaeta , 2009).

#### **1.4 Hemaglutinina**

La hemaglutinina es una proteína de membrana tipo 1 la cual es codificada por el segmento 4 del ARN viral. Esta proteína está constituida de 566 aminoácidos, es la más abundante de las dos proteínas de superficie del virus (hemaglutinina y neuraminidasa). En su estructura se pueden apreciar tres regiones: un péptido señal en la región amino terminal, un ectodominio largo y una región transmembranal. La hemaglutinina es la responsable del reconocimiento al receptor celular. Esta proteína se une al ácido siálico a través de un enlace glicosídico  $\alpha$ 2-3 para las aves y  $\alpha$ 2-6 para mamíferos (Zhao C & Pu J, 2022). No obstante, estos dos enlaces glicosídicos se encuentran en el cerdo por lo que estos animales son susceptibles de infección tanto por cepas aviarias como de mamíferos (Sriwilaijaroen & Suzuki, 2012).

La hemaglutinina es una proteína que se secreta como un precursor denominado HA0 el cual es procesado para obtener la proteína madura y funcional. La síntesis de esta proteína se realiza en el retículo endoplásmico donde se glicosila en residuos de asparagina y se pliega como trímero con uniones no covalente y con la ayuda de chaperonas. En su paso por el complejo de Golgi, esta proteína pasa por un proceso adicional de acilación en los residuos de cisteína lo cual contribuye a la capacidad de fusión de membranas y al ensamble del virón durante los procesos de morfogénesis viral (Lakadamyali M *et al.*, 2004).

Un tercer proceso incluye el procesamiento proteolítico, lo cual da lugar a dos subunidades denominadas HA1 y HA2 unidas a través de diferentes interacciones que incluyen enlaces disulfuros, puentes salinos y puentes de hidrógeno. En la estructura de estas subunidades se aprecia un ectodominio en el tallo de la molécula, así como cuatro subdominios denominados: subdominio de unión al receptor, subdominio de esterasa vestigial, subdominio de fusión de membrana y el subdominio transmembranal (Lakadamyali M *et al.*, 2004). HA1 es un polipéptido de 320 residuos y presenta el dominio de esterasa vestigial

que está estructurado en dos pequeñas regiones que incluyen 53 aminoácidos del amino terminal (60-112) y 21 aminoácidos (266-277) del carboxilo terminal y el dominio de unión al receptor que se encuentra localizado en la parte central de la subunidad HA1. Por su parte HA2 se compone de 221 residuos y está constituido por un ectodominio largo de 166 aminoácidos (335-500) donde se encuentra el dominio de fusión, además, presenta un dominio transmembranal que mantiene unida la hemaglutinina en la envoltura viral. Estructuralmente, el dominio de unión y el dominio de esterasa vestigial comprenden la cabeza globular mientras que el dominio de fusión, el ectodominio y el dominio transmembranal constituyen el tallo de la hemaglutinina (Carter & Iqbal, 2024).

### **1.5 Dominio de unión al receptor**

La hemaglutinina presenta una cabeza globular en la subunidad HA1 donde se encuentra localizado el sitio de unión al receptor celular. Cada una de las moléculas que forman el trímero presentan este sitio de unión y todas las hemaglutininas de virus influenza A de aves son capaces de unirse al ácido siálico, a diferencia de las hemaglutininas de murciélagos que se unen a moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (Wu & Wilson, 2020). Este sitio de unión está constituido por tres elementos de estructura secundaria los cuales forman dos bucles denominados bucle 130, bucle 220 y una estructura denominada hélice 190. Aunque la composición de aminoácidos en este sitio de unión puede variar dependiendo de la hemaglutinina, existen varios aminoácidos que se conservan y que son clave en la interacción con el ácido siálico (Carter & Iqbal, 2024). Entre ellos destacan W153, H183, L194, y la Y195. Sin embargo, dependiendo del subtipo de la hemaglutinina existen variaciones en los aminoácidos que pueden interactuar con el ácido siálico. Por ejemplo, existe evidencia de que en H3 los aminoácidos Y98, W153, E190, Y195 and H183 pueden interactuar con el ácido siálico a través de múltiples puentes de hidrógeno. Asimismo, el perfil de glicosilación también puede ser un factor que determina la interacción del RBD con el ácido siálico (Luzco J *et al.*, 2021).

### **1.6 Dominio de fusión**

Para que el virus de la influenza penetre al citoplasma celular requiere de un péptido con una pequeña secuencia de 23 aminoácidos en la región amino terminal de la subunidad AH2 denominada dominio de fusión. Este dominio se forma por el proceso proteolítico de la hemaglutinina durante la formación de las subunidades AH1 y AH2. El péptido de fusión presenta pocas variaciones entre las 16 hemaglutininas de aves. Se encuentra localizado en el extremo amino terminal de AH2 y su composición tiene un carácter hidrofóbico

(Sriwilajaroen & Suzuki, 2012).

Siendo el dominio de fusión una región constituida de aminoácidos hidrofóbicos, se facilita la interacción con la membrana endosomal durante el proceso de penetración del virus influenza (y muchos otros virus). La fusión de este dominio con la membrana endosomal se realiza cuando el ambiente endosomal se torna ácido, lo que permite un cambio conformación que transloca el péptido de fusión presente en pH neutro a exponerse e interactuar con la membrana endosomal formando poros de suficiente tamaño para que el complejo ribonucleoproteico del virus sea trasladado al citoplasma donde se inicia el proceso de biosíntesis tanto de la replicación como la transcripción del genoma con la producción de RNAs mensajero y por consecuencia proteínas virales (Lakadamyali M *et al.*, 2004).

### **1.7 Impacto de mutaciones en la hemaglutinina viral**

El virus de la influenza posee mecanismos de mutación que pueden ir desde cambios puntuales hasta un intercambio de segmentos génicos. Los cambios puntuales se denominan deriva antigénica y resulta en la evolución gradual de las cepas virales que se da por mutaciones puntuales que pueden impactar en el sitio antigénico o en el dominio del receptor. Por otra parte, el intercambio de segmentos génicos se conoce como desplazamiento de segmentos, que puede resultar en la formación de una nueva cepa de virus ya que puede existir un reordenamiento genético y un intercambio de segmentos completos; este tipo de mecanismo ha sido el principal responsable de la generación de cepas pandémicas (Griffin y Tompkins, 2023).

Como la HA está en la superficie, es fácilmente reconocida por los anticuerpos del hospedero y el virus puede pasar por procesos de neutralización por estos anticuerpos al evitar la interacción entre la hemaglutinina y el ácido siálico. No obstante, existen mecanismos por los cuales el virus puede escapar del sistema de defensa del hospedero. Estos mecanismos ocurren durante el ciclo de replicación viral (Du *et al.*, 2021). Por ejemplo, la ARN polimerasa viral puede introducir errores con alta frecuencia durante la síntesis de ARN viral. Durante la replicación, estos errores pueden generar variantes de la HA permitiendo que el virus cambie su fenotipo, lo que puede conllevar a escapar al reconocimiento por los anticuerpos neutralizantes y por consecuencia evadir la neutralización. Durante la deriva antigénica, las secuencias de aminoácidos se pueden cambiar por estas mutaciones en áreas que están expuestas al reconocimiento de anticuerpos, así como a las regiones requeridas

para la unión al receptor (Gamblin *et al.*, 2021).

Aunque la deriva antigénica puede producir un cambio en la antigenicidad o en su capacidad de unión al receptor, existe evidencia de 19 subtipos de hemaglutinina 16 de las cuales circulan en aves y tres en murciélagos (Fereidouni *et al.* 2023). Si bien los subtipos H1, H2 y H3 han sido los responsables de las últimas cuatro pandemias, el potencial de reordenar los segmentos génicos durante los procesos de replicación puede generar un cambio drástico en el fenotipo de los virus al reemplazar uno o varios segmentos generando una nueva cepa. (Kirkpatrick *et al.*, 2018).

Lo anterior, da importancia sobre estos dos mecanismos de mutación; la deriva antigénica y el desplazamiento de segmentos del virus en la generación de nuevas variantes. Un ejemplo claro es el subtipo H1N1 responsable de la pandemia del 2009, esta cepa viral fue una variante del subtipo H1N1 ya que presentaba segmentos génicos de dos cepas porcinas, una cepa aviar y una cepa humana. Lo anterior, aunado a la generación de una mutación por deriva antigénica, permitió traspasar la barrera de la especie porcina a la población humana con los resultados registrados en todo el mundo.

### **1.8 Caracterización genética del virus de la influenza**

El virus de influenza como muchos otros tipos de virus, posee una alta variabilidad genética que le provee de una ventaja evolutiva que le permite mantener una constante adquisición de características que se suman a su virulencia o patogenicidad. Estudios de caracterización genética del virus de la influenza han permitido determinar el grado de similitud que hay entre ellos; monitorear los cambios a lo largo del tiempo; identificar cambios genéticos que impactan las propiedades del virus; evaluar la efectividad de una vacuna contra un virus de la influenza en particular; así como monitorear los cambios genéticos en los virus de la influenza propios de animales que podrían infectar a los seres humanos (Taubenberger J & Morens DM, 2020).

El alineamiento de secuencias y la obtención de árboles filogenéticos para el análisis de la evolución a lo largo de los años utilizan diferentes métodos de alineamiento donde destaca el método CLUSTALW, que está basado en un alineamiento progresivo donde comienza alineando pares de secuencias por dos diferentes métodos ( k-tuple o programación dinámica completo) de donde se obtienen medidas de distancia con las que se va formando el árbol guía y finalmente alinea progresivamente las secuencias más cercanas (Thompson *et al.*,

1994).

Para la secuenciación de muestras de ADN se utiliza principalmente productos derivados de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para posteriormente utilizar alguno de los métodos de secuenciación y proceder a su análisis, una desventaja de este procedimiento es el costo que representa la secuenciación en una gran cantidad de muestras, por lo que se han desarrollado metodologías que permitan generar un análisis previo de los candidatos provenientes de la PCR para poder seleccionar muestras con posibles mutaciones (Hashim *et al.*, 2019). La PCR acoplada a la técnica de polimorfismo de conformación de cadena simple (PCR-SSCP) es un método utilizado para genotipificar productos de PCR de múltiples organismos (Badi a *et al.*, 2021). En lo particular la SSCP permite la detección de polimorfismos de un solo nucleótido y mutaciones que no pueden ser detectadas por métodos como en la técnica de polimorfismo de fragmento largo (RFLP). Esta técnica de SSCP se basa en la observación de los fragmentos de DNA a través de diferentes patrones que genera una conformación específica (Stipoljev *et al.*, 2020). La técnica fue utilizada por primera vez para identificar posibles mutaciones dentro de productos de PCR, ambas técnicas acopladas se basan en que la conformación tridimensional de las secuencias al plegarse se ven afectadas por una mutación en la secuencia primaria que altera esta conformación física (Hashim *et al.*, 2019).

### **1.9 Efecto de la pandemia de COVID-19 en la circulación del virus de la influenza**

Con la llegada del virus SARS-COV2 a finales de 2019 y su expansión en años posteriores, se implementaron diferentes medidas preventivas para disminuir el número de contagios de esta enfermedad, algunas de las recomendaciones y medidas fue el uso obligatorio de cubrebocas, de gel con base alcohol, la distancia entre personas en lugares públicos, entre otros; esto a la vez que ayudó a disminuir los contagios del virus SARS-COV2, también ayudó a que los casos de otros virus se dieran a la baja, incluido el virus de la influenza que en años anteriores a la pandemia de COVID-19 tuvieron pequeñas epidemias a lo largo del país (Leung *et al.*, 2020). Es importante mencionar que los virus de influenza estacional tienen un incremento en los periodos de invierno. En un estudio realizado por Eisen A, y colaboradores en 2021 donde analizaron un total de 1000 muestras, solo el 3.18% resultaron positivas para el virus de influenza A, mientras el 41.8% de las muestras resultaron positivas para SARS-CoV2, lo que nos habla de una baja en los casos reportados para otros virus

durante esta pandemia.

En 2022, Dhanasekaran y colaboradores realizaron un análisis filogenético de máxima verosimilitud de secuencias de la hemaglutinina del virus de la influenza estacional desde el brote del virus SARS-CoV-2. En este estudio, se detectaron pocos casos del subtipo A(H1N1) del virus de la influenza desde abril del 2020, encontrando además que algunos linajes de este subtipo, que principalmente habían estado circulando en África, para el 2021 fueron detectados principalmente en la India, lo que nos habla de que a pesar de un número bajo de casos reportados la circulación de este subtipo de influenza continuo expandiéndose entre la población mundial.

## **2. JUSTIFICACIÓN**

La subunidad HA1 posee 5 sitios antigénicos que se caracterizan por ser susceptibles a mutaciones. Al interactuar con el ácido siálico para el anclaje a la envoltura viral, hace que los cambios en esta región sean de importancia para la patogenicidad y virulencia del virus. El virus de influenza posee un potencial pandémico que lo ubica como uno de los patógenos de importancia para la salud pública, por lo que se realiza una vigilancia epidemiológica constante. El conocer los pequeños cambios que vaya adquiriendo este virus y comprender a qué escala impactan, nos permitirá generar información que sea de ayuda en caso de una emergencia de salud pública.

### **3. HIPÓTESIS**

Los cambios aminoacídicos entre la secuencia de referencia y la secuencia de análisis se verán reflejados en la estabilidad de la interacción con el receptor de ácido siálico.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1 OBJETIVO GENERAL

Analizar *in silico* la subunidad HA1 del virus de la influenza A(H1N1)pdm09 de cepas circulantes en una población Mexicana.

### 4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Generar información nucleotídica de la subunidad HA1 de la hemaglutinina a partir de aislados clínicos.
2. Analizar *in silico* el efecto de las mutaciones identificadas sobre la estructura de la hemaglutinina viral.
3. Determinar el posible impacto de las mutaciones con la interacción a los receptores siálicos del hospedero mediante análisis *in silico*.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1 Diagnóstico de influenza A(H1N1)pdm09 por RT-PCR en tiempo real

Los tubos con medio de transporte e hisopo fueron agitados en el vórtex de 5 a 10 s, para después agitar el hisopo y comprimirlo en las paredes del mismo tubo de muestra. Finalmente se deshecha el hisopo y se procesa la muestra según las instrucciones de los Lineamientos para la Vigilancia Epidemiológica de Influenza por la Secretaría de Salud.

### 5.2 Extracción de ARN

Las muestras fueron extraídas previamente con el MiniKit QIAamp Viral RNA (250) de Qiagen, utilizando las instrucciones y recomendaciones del fabricante. Se utilizó un volumen de 140 µL de muestra de ARN viral y 560 µL de búfer AVL/RNA en un microtubo de 1.5 mL los cuales fueron incubados por 10 minutos a temperatura ambiente y centrifugados levemente. Posteriormente se añadieron 560 µL etanol (96-100%), se agitó en un agitador tipo vortex y se centrifugó levemente. De la solución anterior se adicionaron 630 µL en una columna QIAamp y se centrifugó a 8000 rpm durante 60 segundos, finalmente se desechó el filtrado por medio de decantación, este último paso fue realizado por segunda vez, y se procedió a realizar lavados con buffer AW1 en una cantidad de 500 µL y se centrifugó a 8000 rpm por 60 segundos. El filtrado fue decantado y se añadieron 500 µL de búfer AW2 a la columna para proceder a la centrifugación a 13000 rpm durante 3 minutos. Una vez más se decantó el filtrado y se repitió la centrifugación en nuevo tubo colector. Se colocó la columna en un microtubo de 1.5 mL y se añadieron 60 µL del búfer AVE; se incubaron por 1 minuto a temperatura ambiente y se centrifugaron a 8000 rpm por 60 segundos. Se recuperó el ARN en el tubo de 1.5 mL y se guardaron a – 70° C hasta su uso.

### 5.3 Reacción en Cadena de la Polimerasa- Retrotranscriptasa Multisegmento

Para realizar la amplificación de los 8 segmentos de influenza se realizó una RT-PCR basada en la metodología descrita por Zhou y colaboradores en el año 2009, donde utilizando los dominios conservados en los extremos terminales se diseñaron un par de iniciadores MBTuni12 y MBTuni13 con el fin de aprovechar los extremos conservados de los 8 segmentos del Virus de influenza A y el SuperScript III Platinum One-Step RT-PCR kit (Invitrogen) de acuerdo con las condiciones sugeridas por el fabricante.

**Tabla 1. Componentes de la mezcla de reacción para la retrotranscripción y amplificación del genoma viral.**

<b>Componente</b>	<b>1 Reacción (µL)</b>
Master Mix 2X	12.5
SuperScript™ III RT/Platinum™ Taq Mix	0.5
MBTuni12 ( 10 µM)	0.5
MBTuni13 ( 10 µM)	0.5
Agua	6
Muestra	5

Volumen total de la mezcla de reacción, 25 µL.

Como control negativo (NTC) en estos ensayos se utilizó agua libre de nucleasas y se realizaron los ensayos preparando soluciones con las cantidades correspondientes a 20 reacciones, descritas en la **Tabla 1**.

Para comenzar con el protocolo de termociclador las muestras fueron centrifugadas y se llevaron a termociclador Veriti (Applied Biosystems) para la RT-PCR multisegmento utilizando los parámetros de 42 °C durante 60 min, 94 °C durante 2 min y luego 5 ciclos (94 °C durante 30 s, 45 °C durante 30 s y 68 °C durante 3 min), seguidos de 31 ciclos (94 °C durante 30 s, 57 °C durante 30 s y 68 °C durante 3 min).

#### **5.4 Electroforesis en gel de agarosa**

Con el fin de visualizar la integridad de los segmentos génicos de las muestras del virus de influenza A, se realizaron geles de agarosa para realizar el procedimiento de electroforesis.

##### **5.4.1 Preparación del búfer de carga**

Utilizando un tubo estéril de 1.5 mL, se agregaron 200 µL de búfer de carga 6X TBE, 400 µL de glicerol (100 %) y 600 µL de agua libre de nucleasas y 12 µL de GelRed Nucleic Acid Gel Stain, 10,000X (Biotium), la mezcla fue homogenizada y fue alicuotada en volumen de 100 µL en microtubos de 1.5 ml estériles y posteriormente resguardados en congelación.

#### **5.4.2 Preparación del búfer TBE**

Se preparó una solución stock de búfer TBE 5X con 54 g búfer Tris base (Sigma), 27.5 gramos de ácido bórico (US Biological) y 4.5 g de EDTA (US Biological) para una solución de 1 L. Se ajustó el pH a 8.4 y se aforó a 1 L con agua bidestilada para obtener una solución de trabajo al 0.5X.

#### **5.4.3 Preparación del marcador de peso molecular (MPM)**

Se adicionaron 49  $\mu\text{L}$  de agua libre de nucleasas a un microtubo estéril y se añadió 1  $\mu\text{L}$  del MPM (1 Kb DNA plus Ladder, Invitrogen) y se procedió a homogenizar la muestra. Estas soluciones fueron conservadas en congelación hasta su uso.

#### **5.4.4 Preparación del gel de agarosa**

Se preparó un gel de agarosa al 1 %, añadiendo 0.35 g de agarosa ultrapura (Invitrogen) en 35 mL de TBE 0.5X. a un matraz Erlenmeyer. Se llevó la mezcla a calor por 60 segundos en intervalos de 20 seg en microondas con el fin de obtener una solución homogénea. Una vez a temperatura ambiente, se vertió en la plataforma de fundición de 7 x 7 cm para un gel de 10 pozos, el cual se dejó gelificar por una hora previo a su uso.

Las muestras fueron cargadas por medio de una mezcla en la cual se añadió búfer TBE 0.5X y se agregaron entre 1 y 5  $\mu\text{L}$  de muestra, agua o MPM previamente combinados con 1  $\mu\text{L}$  de búfer de carga. El proceso de electroforesis siguió el protocolo de 100 V (constante) por 40 min y se visualizó en un fotodocumentador (Fisher Scientific) con luz ultravioleta (260 nm). Una vez confirmada la presencia e integridad del ADN correspondiente a los segmentos virales, se resguardó cada uno para su posterior uso en la amplificación del segmento HA1 de la hemaglutinina.

#### **5.4.5 Selección de muestras para análisis de subunidad HA1**

Para seleccionar las muestras que serían analizadas por secuenciación, se tomaron 25 muestras de la temporada 2018 -2019 y se amplificó un segmento de aproximadamente 339 pb que se analizó por electroforesis en gel de polimorfismos de conformación de cadena simple (SSCP) para identificar muestras con diferencias en la secuencia nucleotídica de una región de la subunidad HA1.

#### 5.4.6 PCR para segmento de ~ 300 pb de la subunidad HA1

Se seleccionó un par de iniciadores que flanquearan una región de aproximadamente de 339 pb de entre aquellos propuestos por el CDC en el 2009 específicos para secuenciar el genoma del virus de la influenza A H1N1pdm (CDC, Sequencing Primers and Protocol, 2009). Los iniciadores utilizados se muestran en la **Tabla 2**.

**Tabla 2. Iniciadores para amplificar segmento de la subunidad HA1.**

Nombre	Iniciador
HA1-F190	5'AACTATGCAAATAAGAGGGGTA 3'
HA-F1-R	5'CAGAAACAGCTATGACCTCATGATTGGGC CAY 3'

Para cada muestra realizamos una PCR utilizando GoTaq Green 2X (Promega) 12.5 y los parámetros de termociclador fueron 1 ciclo de 95°C por dos minutos, 35 ciclos de 95°C por 30 segundos, seguidos de 55°C por 45 segundos y 72°C por 30 segundos, finalmente 1 ciclo de 72°C por 7 minutos y 18°C hasta que se retiren las muestras. Los productos de amplificación se guardaron en congelación hasta su uso.

#### 5.4.7 Electroforesis de polimorfismos de conformación de cadena simple

El ensayo incluye el montaje de la cámara de electroforesis, la cual debe de ser limpiada con sus materiales como ligas, placas de virio y broches con agua bidestilada. Se debe realizar el montaje correcto, iniciado con dos tiras blancas de plástico que sirven para separar las placas de cristal y general el espacio equivalente al ancho del gel, el cual es sellado con agarosa al 1% en los bordes laterales. Respectivamente se agregó en un tubo falcón las cantidades de 37.5 mL de agua bidestilada, 10 mL de acrilamida, 2.5 mL de TBE 10X, 80 µL de TEMED y 250 µL de APS al 10%, e inmediatamente se vació entre los cristales previamente sellados y se colocó el peine para generar los pozos del gel, esto se dejó polimerizar aproximadamente 40 minutos. Una vez transcurrido este tiempo, las placas de cristales que contienen el gel polimerizado se ensamblan con la cámara ajustando los broches de cada lateral. Se procedió a agregar buffer TBE 0.6X hasta la marca que indica el nivel óptimo y se realizó una pre-corrida con los siguientes parámetros: 100 Volts, 45 mAmps por

1 hora. Transcurrido el tiempo, se colocaron las muestras a analizar en hielo y se añadió a cada una de ellas 4  $\mu$ L de buffer de carga y se homogeneizaron para posteriormente colocarlos en los pozos del gel de poliacrilamida. La electroforesis final siguió los siguientes parámetros: 150 Volts, 45 mAmps por 15 horas.

#### **5.4.8 Tinción con plata**

Para visualizar las bandas amplificadas en la técnica de SSCP, se realizaron soluciones fijadoras, comenzando con la tinción de plata, donde en esta solución la técnica se basa en que los iones de plata se unen a las cadenas laterales de los aminoácidos, específicamente en los grupos carboxilo y que posteriormente se visualizarán como bandas o manchas de color marrón ( Beidler et al., 1982).de esta técnica que puede teñir las bandas amplificadas se buscaron patrones de bandeo similares para poder analizar al menos una muestra de cada uno de los grupos de patrón de bandeo.

#### **5.4.9 Diseño de iniciadores**

Una vez seleccionadas las muestras candidatas a análisis de secuenciación, se realizó la obtención de la subunidad HA1 completa, para la cual se realizó una secuencia consenso, a partir de la información de la base de datos IRD (Influenza Research Database) , utilizado herramientas bioinformáticas como MUSCLE, BLAST y la herramienta Bioedit .

Se seleccionaron aquellas secuencias que cumplieran con los siguientes parámetros:

- Segmentos de Hemaglutinina Completos
- Virus de Influenza tipo A
- Subtipo de Influenza A (H1N1)pdm09
- Rango de fecha de 2017-2022
- Hospedero humano
- México como grupo geográfico

Se utilizó la base de datos del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI) y se tomaron las secuencias en formato FASTA. Utilizando las herramientas bioinformáticas BLAST y Bioedit, se realizó un alineamiento múltiple de las secuencias seleccionadas.

En la **Figura 2**, se puede observar las secuencias seleccionadas, siendo todas provenientes de virus de influenza A correspondientes a la Hemaglutinina, aisladas entre 2017 y 2022 en México.

Número de acceso	Organismo	País	Región	Año	Tamaño (pb)
MF593583.1	Virus influenza A	México	HA	2017	1701
MF593575.1	Virus influenza A	México	HA	2017	1701
MF593567.1	Virus influenza A	México	HA	2017	1701
MF593559.1	Virus influenza A	México	HA	2017	1701
MN581295.1	Virus influenza A	México	HA	2019	1752
MT874033.1	Virus influenza A	México	HA	2020	1752
MT331259.1	Virus influenza A	México	HA	2020	1752
MT331248.1	Virus influenza A	México	HA	2020	1752
MT331244.1	Virus influenza A	México	HA	2020	1752
MT244884.1	Virus influenza A	México	HA	2020	1752
MT244877.1	Virus influenza A	México	HA	2020	1752
MT244871.1	Virus influenza A	México	HA	2020	1752
MT244863.1	Virus influenza A	México	HA	2020	1752
MT168088.1	Virus influenza A	México	HA	2020	1752
MT168080.1	Virus influenza A	México	HA	2020	1752
OQ245870.1	Virus influenza A	México	HA	2022	1752
OQ245878.1	Virus influenza A	México	HA	2022	1752
OQ245886.1	Virus influenza A	México	HA	2022	1752
OQ245894.1	Virus influenza A	México	HA	2022	1752
OQ232102.1	Virus influenza A	México	HA	2022	1752
OQ203472.1	Virus influenza A	México	HA	2022	1752
OQ203464.1	Virus influenza A	México	HA	2022	1752
OQ203456.1	Virus influenza A	México	HA	2022	1752
OQ203448.1	Virus influenza A	México	HA	2022	1752
OQ203440.1	Virus influenza A	México	HA	2022	1752
OQ203432.1	Virus influenza A	México	HA	2022	1752
OP694748.1	Virus influenza A	México	HA	2022	1752

**Figura 2 .Números de acceso de NCBI utilizados para el diseño de iniciadores para la amplificación de la subunidad HA1.** Se muestran en la imagen los números de acceso de cada una de las secuencias correspondientes al segmento de la Hemaglutinina del virus de influenza A , aislados en México en el periodo del 2017-2022.

Se utilizó el software Oligo7 (Molecular Biology Insights, 2024) para realizar el diseño de iniciadores sentido y antisentido para la amplificación de la secuencia nucleotídica de la HA1 de la hemaglutinina (**Tabla 3**).

**Tabla 3. Iniciadores diseñados para amplificar la subunidad HA1 de la hemaglutinina del virus de la influenza A.**

Nombre	Iniciador	Tm	Tamaño
HA1-F190	5'AACTATGCAAATAAGAGGGGTA 3'	56.1°	23 nt
HA1-R869	5'GTGGACTGGTGTATCTGAAATG 3'	55.6°	22 nt

## 6.5 PCR para amplificar la HA1

Se preparó la mezcla de reacción como se muestra en la **Tabla 4** para un volumen final de 25  $\mu\text{L}$ , y se visualizó en gel de agarosa al 1 % añadiendo 1  $\mu\text{L}$  de muestra con un  $\mu\text{L}$  de buffer de carga al gel.

**Tabla 4. Mezcla de reacción para amplificación de subunidad HA1.**

Componente	Volumen ( $\mu\text{L}$ )
Master Mix	12.5
Iniciador HA1-F190	0.5
Iniciador HA1-R-869	0.5
Agua	10.5
Muestra	1

Los amplicones se resguardaron en congelación hasta su uso.

## 6.6 Obtención del vector plasmídico con la secuencia HA1

Para realizar la secuenciación de la HA1, se subclonó la secuencia nucleotídica previamente amplificada de HA1 en el vector pCR 2.1-TOPO® de Invitrogen, se transformaron células competentes de E. coli DH5a y se cultivaron en agar LB, posteriormente en caldo LB para la purificación del vector con el inserto.

### 6.6.1 Preparación de agar LB

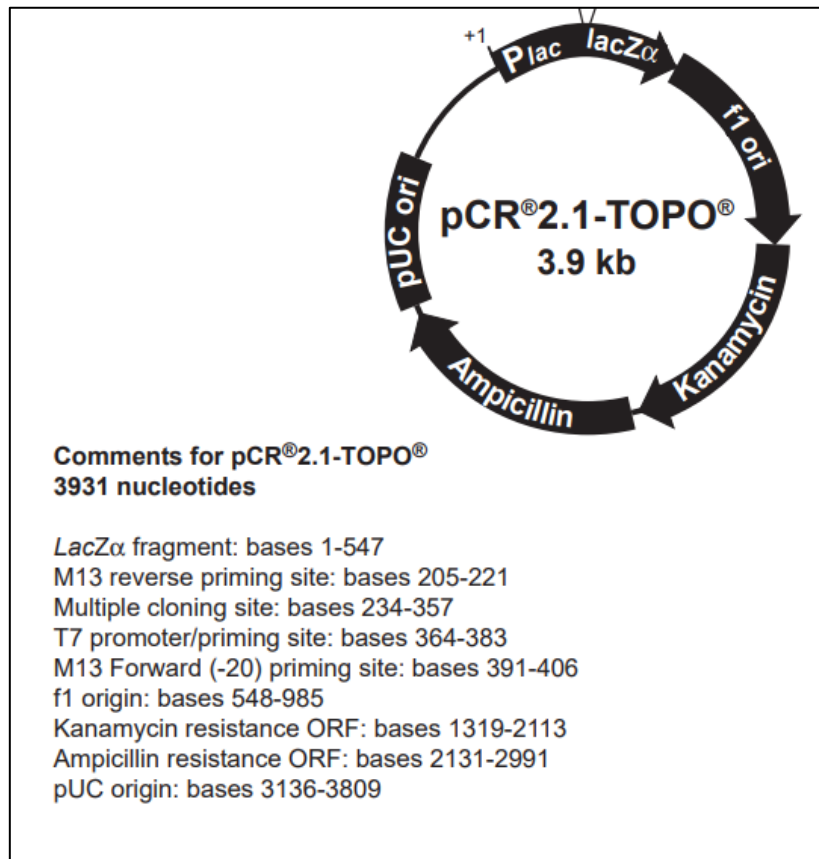
Para el aislamiento de las clonas con el vector plasmídico y la secuencia de la HA1, se utilizaron placas de agar LB Miller. Las cantidades utilizadas comienzan con 24 g de agar LB Miller (Applichem, lote 0927-1/44) que se disolvieron en 600 mL de agua bidestilada que fueron esterilizados después de separar 300 mL en dos frascos. En campana y con el medio a temperatura ambiente, se adicionó a uno de los matraces 1.5 mL de kanamicina 10 mg/mL, para obtener una concentración final de 50 mg/mL, que se homogenizó y se vació en 24 cajas Petri estériles desechables que fueron etiquetadas de acuerdo a la presencia o ausencia de antibiótico.

### 6.6.2 Preparación de caldo LB

Utilizando 7 gramos de caldo LB Miller (US Biological, Lote L8102422 08102422) se realizó una solución con 300 mL de agua bidestilada que fueron disueltos hasta obtener una solución homogénea. De la solución anterior se elaboraron alícuotas en volúmenes de 50 y 100 mL en frascos estériles los cuales se esterizaron a 121°C/15min, y posteriormente se resguardaron en temperatura ambiente hasta su uso.

### 6.6.3 Subclonación en vector pCR 2.1 TOPO

Se utilizó el TOPO® TA Cloning® Kit de Invitrogen que contiene el vector pCR 2.1-TOPO® (figura 3).



**Figura 3. Mapa del vector pCR 2.1-TOPO® de Invitrogen.** Se muestran los sitios importantes que componen al vector plasmídico como el sitio del promotor, los ORF de resistencia antibióticos y el sitio de origen pUC.

Para preparar la reacción de subclonación del segmento de la subunidad HA1 se realizó la siguiente mezcla:

**Tabla 5. Reactivos para subclonación.**

<b>Reactivo</b>	<b>Volumen</b>
Vector plasmídico	1 $\mu$ L
Solución de sales	1 $\mu$ L
Agua	3 $\mu$ L
Producto de PCR	1 $\mu$ L

Se agregaron 2  $\mu$ L de la reacción de clonación TOPO® en un vial de One Shot® químicamente competente de *E. coli* y se mezcló suavemente para proceder a ser incubado en hielo por 30 minutos. Una vez transcurrido el tiempo se aplicó un choque térmico a las células a 42°C por 30 segundos y se colocó en hielo nuevamente. Se adicionaron 250  $\mu$ L de medio LB previamente preparado a medio ambiente y se dejó incubando en agitación a 37°C por una hora a 200 rpm. Finalmente se tomaron 50  $\mu$ L del vial de cada una de las muestras y se extendieron en una placa atemperada con LB, que se dejaron incubar toda la noche a 37°C.

#### **6.6.4 Transformación de células competentes de *E. coli* DH5alpha**

La transformación de *E. coli* fue realizada bajo las especificaciones del kit utilizado TOPO® TA Cloning® Kit de Invitrogen, de las cuales se mencionan las siguientes condiciones: Previo al ensayo se atemperaron placas de agar Lb con y sin antibiótico, además una alícuota de 1mL de caldo LB se colocó en agitación a 37°C y el termoblock se llevó hasta los 42°C. En un microtubo de cepa *E. coli* DH5 $\alpha$  competente (aprox. 100  $\mu$ L) se agregaron 5  $\mu$ L del plásmido para subclonación PCR TOPO 2.1 y se mezcló de manera suave para ser incubado en hielo por 60 minutos, transcurrido ese tiempo se colocó por 90 segundos a 42°C en termoblock y se pasó a incubar en hielo por 2 minutos. Finalmente se añadieron 1 mL de LB a 37°C y se incubó por una hora en agitación. Se inocularon las placas de agar LB con kanamicina y de LB sin antibiótico con 100  $\mu$ L de cultivo utilizando el asa en triángulo.

#### **6.6.5 Aislamiento de clonas**

De acuerdo con el número de clonas obtenidas, en un área de trabajo estéril se tomaron con un asa bacteriológica cada una de las colonias crecidas en una nueva placa por estría simple.

Posteriormente se dejaron crecer un día en la incubadora a 36.5 °C.

#### **6.6.6 Cultivo en caldo LB**

La siembra en caldo LB para las muestras fue realizada en área de mechero, utilizando tubos de ensayo con tapón de rosca de 16 × 150, medio LB y utilizando kanamicina como antibiótico. El medio LB con kanamicina fue colocado en cada uno de los tubos en volúmenes de 3mL por tubo y con un asa bacteriológica se sembró cada una de las muestras candidatas. Los tubos fueron llevados a incubación con agitación de 300 rpm durante toda la noche a una temperatura de 36.5 °C.

#### **6.6.7 Preservación en glicerol**

Para el resguardo del plásmido recombinante se realizó en condiciones de esterilidad alícuotas para preservación en ultracongelación, donde en un microtubo de 1.5 mL se adicionaron 250 µL de glicerol al 60% y 750 µL de cultivo en medio LB líquido, la solución fue homogeneizada y se generaron alícuotas de 200 µL que se colocaron en criotubos que fueron sellados con Parafilm y almacenados para su resguardo.

#### **6.6.8 Purificación por Minipreparación**

Se utilizó el Kit PureLink™ Quick Plasmid Miniprep (Invitrogen) y se siguieron las especificaciones del fabricante, donde se menciona:

Se tomaron de 1–5 mL del cultivo LB previamente centrifugados durante la noche (utilice 1–2 ×10<sup>9</sup> células de *E. coli* para cada muestra). De esta muestra se desechó todo el medio y se añadieron 250 µL de la solución R3 para posteriormente homogeneizar con el sedimento. Se añadieron 250 µL de la solución de tampón de lisis L7, y se mezcló suavemente al invertir el tubo y se incubó a temperatura ambiente por 5 minutos. Posteriormente se agregaron 350 µL de tampón de precipitación N4 y se mezcló inmediatamente hasta homogeneizar y se procedió a centrifugar el lisado a >12 000 × g por un lapso de 10 minutos. Donde el sobrenadante se colocó en una columna giratoria en un tubo de lavado de 2mL y se centrifugó la columna a a 12.000 × g durante 1 minuto. Terminado este tiempo se desechó el sobrenadante y se colocó la columna en el tubo de lavado.

Se agregaron 500 µL de tampón de lavado con etanol a la columna y se dejó incubar por un minuto a temperatura ambiente, se centrifugó la columna a 12 000 x g por un minuto y se

descartó el sobrenadante para colocar posteriormente de nuevo la columna en el tubo de lavado y se agregaron 700  $\mu\text{L}$  de tampón de lavado con etanol a la columna para ser llevado a centrifugación por un minuto a 12.000 x g, una vez transcurrido el tiempo se desechó el sobrenadante y se colocó la columna en el tubo de lavado para centrifugar una vez más utilizando las mismas condiciones, finalmente se desechó el tubo de lavado y colocó la columna giratoria en un tubo de 1.5mL y se agregaron 75  $\mu\text{L}$  de buffer TE en el centro de la columna , este fue incubado por un minuto a temperatura ambiente, y se centrifugó d a 12.000 x g por dos minutos, se descartó la columna y se almacenó el ADN del plásmido a 4 ° C.

### **6.7 Análisis por Secuenciación**

El servicio de secuenciación fue solicitado y realizado por el Instituto Potosino de Investigación, Ciencia y Tecnología (IPICYT) que ofrece un servicio de secuenciación tipo Sanger.

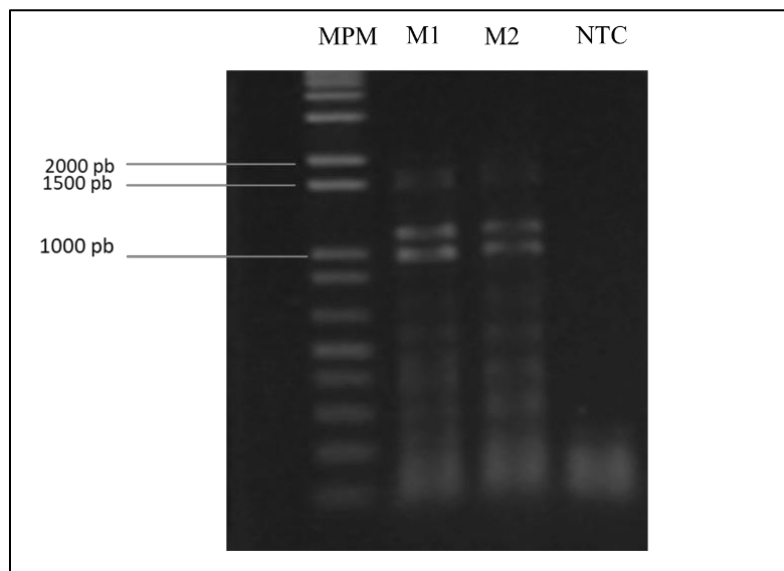
### **6.8 Análisis in silico de las secuencias**

Las secuencias obtenidas serán analizadas in silico para identificar mutaciones y su efecto en la estructura de HA1 y en la interacción con los receptores del hospedero.

## 7 RESULTADOS

### 7.1 Amplificación de segmentos génicos del IAV

Se realizó la amplificación de muestras de influenza A(H1N1)pdm09 de la temporada 2018-2019 (**Figura 4**), utilizando los iniciadores MBT-uni12 y MBT-uni13. Donde podemos apreciar en el gel de agarosa una amplificación para los carriles correspondientes de la muestra 1 (M1) y muestra 2 (M2) en diferentes puntos de acuerdo con el marcador de peso molecular (MPM), dentro de las 1000 y 2000 pares de bases se encuentran los segmentos de mayor peso molecular, siendo uno de estos la Hemaglutinina.



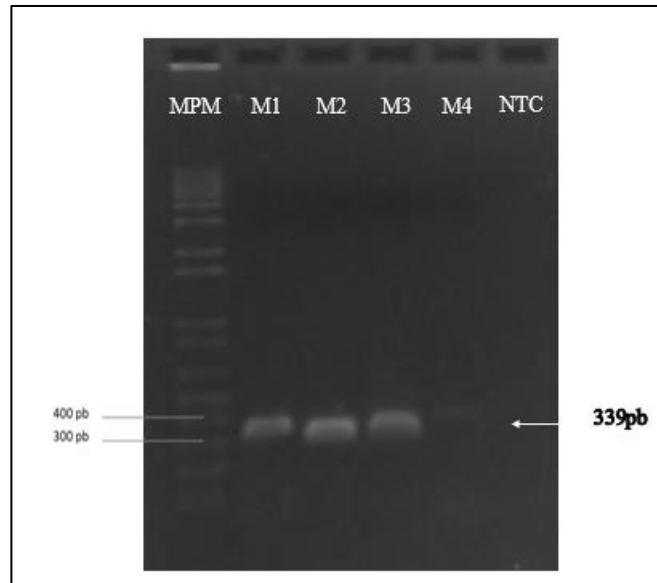
**Figura 4. Muestras de Influenza de la temporada 2018-2019.** En la imagen se muestran los carriles en orden de izquierda a derecha el marcador de peso molecular (MPM), Muestra 1 y muestra 2 (M1 y M2), finalmente se muestra el control negativo (NTC), donde se muestran las bandas correspondientes a los segmentos génicos del virus de influenza A.

### 7.2 Selección de muestras para secuenciación

Con la intención de preseleccionar muestras con características genéticas diferentes en la región de la HA1 para secuenciación, se decidió utilizar la técnica de SSCP ya que permite detectar diferencias a nivel de secuencia primaria, lo cual nos permitiría garantizar la secuenciación de muestras genéticamente diferentes para su comparación. Para ello, amplificamos un fragmento de la subunidad HA1 del gen de la hemaglutinina del virus de influenza.

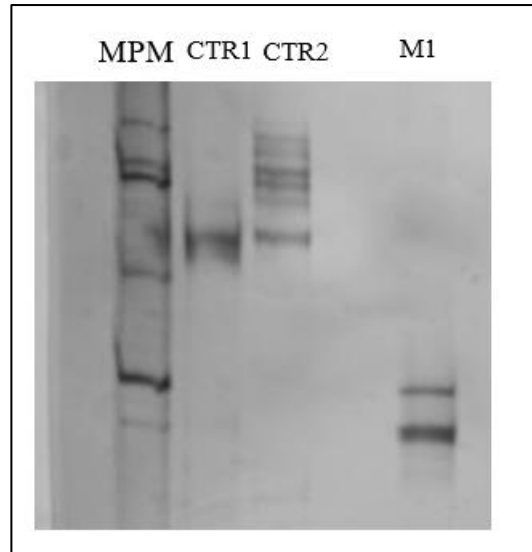
Para poder utilizar la técnica de Polimorfismo de Conformación de Cadena Simple (SSCP) se recomienda utilizar muestras de entre 300 y 400 pares de pares, siguiendo este principio

una vez que se confirmó que la subunidad HA1 está presente en las muestras analizadas, se procedió a amplificar un fragmento más pequeño de 339 pares de bases aproximadamente. **(Figura 5)**. En este caso para las muestras 1, 2 y 3 hubo amplificación entre los 300 y 400 pares de bases, donde esperábamos encontrar una banda correspondiente al fragmento deseado de la subunidad HA1. Estos fragmentos procedieron a ser utilizados para la técnica de polimorfismo de conformación de cadena simple.



**Figura 5. Amplificación de fragmento de la subunidad HA1 del virus de la influenza de la temporada 2018-2019.** Podemos apreciar comenzando de izquierda a derecha, el Marcador de Peso Molecular (MPM), Muestra 1(M1), Muestra 2 (M2), Muestra 3 (M3), Muestra 4 (M4) y Control Negativo (NTC) Además se muestran marcados los fragmentos del marcador molecular que indican los 300 y 400 pares de bases y del lado derecho las amplificaciones que corresponden al fragmento deseado de 339 pb.

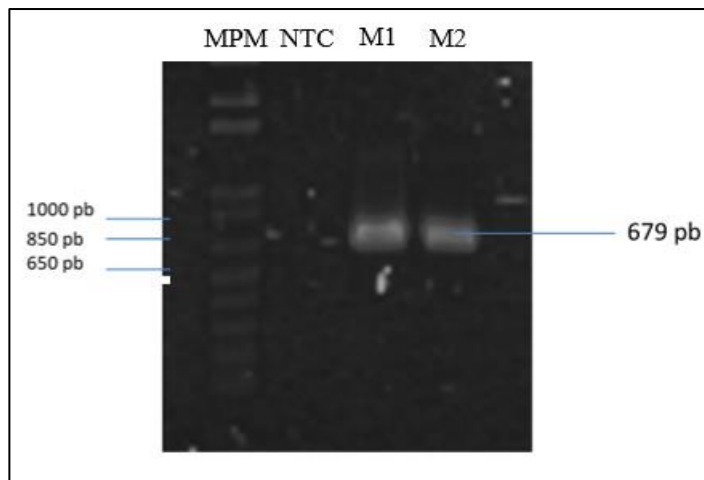
Através de SSCP se analizaron un total de 25 muestras de cada temporada, las muestras utilizadas fueron provenientes de la amplificación del fragmento de 339 pares de bases de la subunidad HA1 que corresponde a muestras del 2018-2019. En la **figura 6** se muestra el patrón electroforético de una muestra y dos controles que corresponden a dos muestras con un patrón ya conocido y estandarizado en el laboratorio de trabajo. El patrón correspondiente al fragmento de la subunidad HA1 que más se repitió durante los ensayos fue el que se observa con la muestra M1, utilizado para discriminar entre un patrón normal de uno que pudiera tener alguna mutación. Aquellas muestras que presentaron un bandeo diferente al de la muestra M1 fueron consideradas como candidatos para la secuenciación.



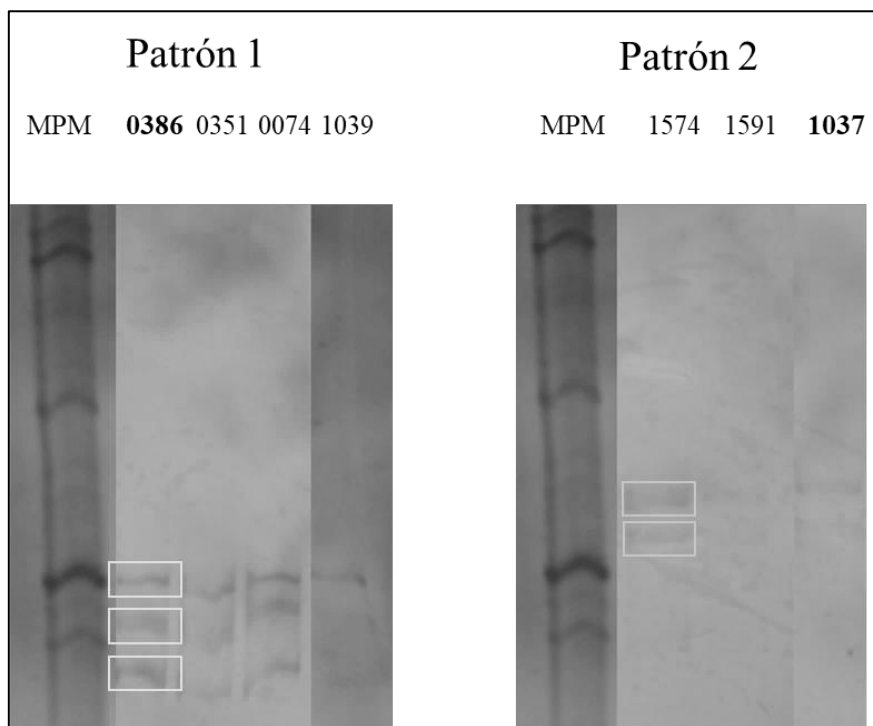
**Figura 6. Gel de poliacrilamida 6% de muestras de influenza de la temporada 2018-2019** podemos apreciar el Marcador de Peso Molecular (MPM), Control 1 (CTR1), Control 2 (CTR2) y Muestra 1 (M1).

### 7.3 Amplificación de la subunidad HA1 del gen de la Hemaglutinina del virus de influenza.

Utilizando los iniciadores que se muestran en la **Tabla 3**. Se amplificó la subunidad HA1 completa, siendo esta de 679 pares de bases aproximadamente (**Figura 7**). De acuerdo al MPM se esperaba encontrar amplificación entre los 650 y 850 pares de bases, donde para las muestras 1 y 2 se estuvo obteniendo bandas dentro de este rango.



**Figura 7 Amplificación de la subunidad HA1 de muestras de influenza de la temporada 2018-2019.** En orden de izquierda a derecha se puede apreciar el Marcador de Peso Molecular (MPM), Control negativo (NTC), Muestra 1 (M1) y Muestra 2 (M2). Además se muestran las bandas correspondientes a los 650, 850 y 1000 pares de bases, con el fin de identificar el amplificado esperado de 679 pb.



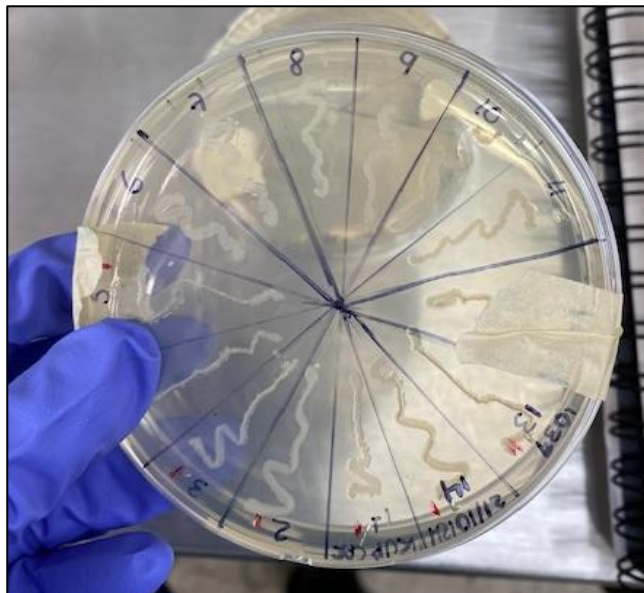
**Figura 8. Análisis de patrones obtenidos por la técnica SSCP en Gel de poliacrilamida 10% de muestras de influenza de la temporada 2018-2019.** Se puede observar en el patrón 1 del lado izquierdo, que las muestras correspondientes a estos bloques poseen patrones de 3 bandas, mientras que el patrón 2 del lado derecho presenta en cada una de sus muestras un patrón de dos bandas. Las muestras seleccionadas fueron 0396 del patrón 1 y del patrón 2 la muestra 1037.

#### 7.4 Caracterización genética de muestras de influenza

Para realizar la selección de las muestras que serían seleccionadas para el proceso de la subclonación, se analizaron los patrones obtenidos en la técnica de SSCP, donde se pueden apreciar dos patrones diferentes. En el primer patrón, se pueden apreciar la amplificación de 3 bandas (**Figura 8**), mientras que para el segundo patrón encontrado, se observan solo dos bandas de amplificación (**Figura 8**).

Después de analizar tanto los patrones obtenidos con la RT-PCR Multisegmento, la PCR específica para el fragmento de la subunidad HA1 y los obtenidos en la técnica de SSCP, se seleccionaron dos muestras que fueron utilizadas para los siguientes análisis. Las muestras correspondieron a cada uno de los patrones obtenidos, siendo nombradas como **HA1-01** (muestra 0386) y **HA1-02** (muestra 1037).

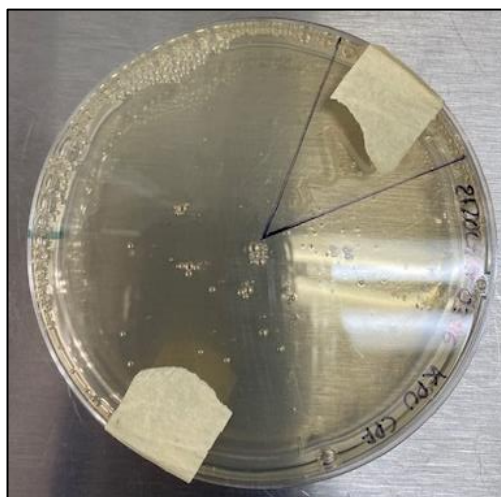
La PCR generada a partir de las colonias de los candidatos sirvió como análisis previo para poder elegir entre las clonas candidatas para la secuenciación, donde, para la muestra HA1-01 solo se seleccionó la clona número 4 mientras que para la muestra HA1-02 no se pudo recuperar una clona que contuviera el fragmento correspondiente a la subunidad HA1.



**Figura 9 . Aislamientos del candidato 1037 en medio con kanamicina para la selección de colonias.** En la placa se puede ver la división de 14 fragmentos en donde se estrió una cepa por división para poder realizar el aislado de cada una de las colonias.

Los valores de cuantificación obtenidos por el Nanodrop fueron los siguientes:

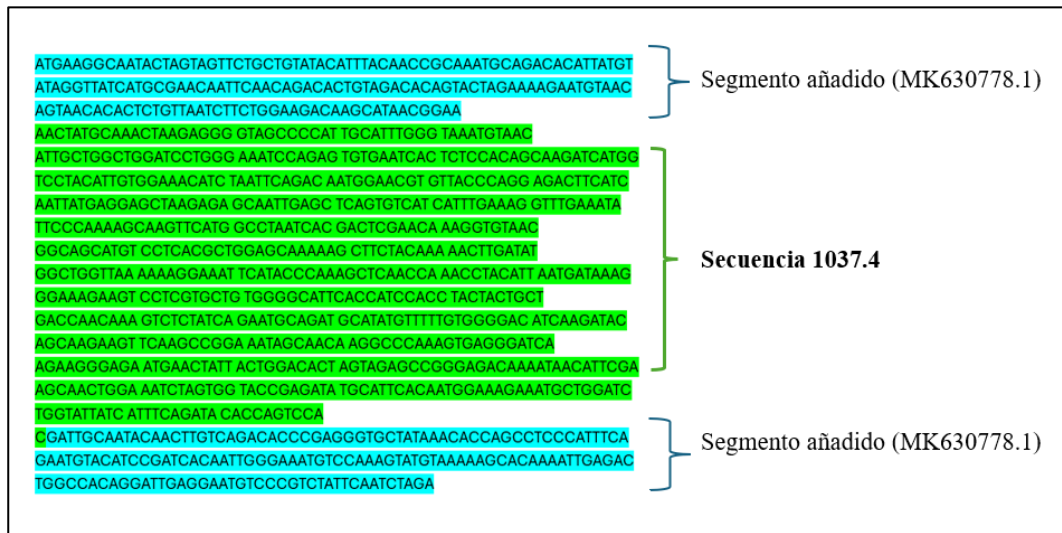
<i>Concentración</i>	<i>260/230</i>	<i>260/280</i>
<b>28.7 ng/ul</b>	<b>2.33</b>	<b>1.84</b>



**Figura 10. Aislamiento del candidato 0386 utilizando kanamicina como medio de selección de colonias.** Se pudo aislar solo un candidato de la muestra 0386, la cual se muestra en la división marcada en la placa petri.

### 7.5 Análisis de la secuencia 1037.4

Partiendo de la secuencia 1037.4 se realizó una búsqueda en la herramienta de Blast con el fin de buscar una secuencia de referencia, con esta búsqueda se obtuvo la secuencia bajo el número de acceso MK630778.1. Se procedió a generar la secuencia reversa complementaria para poder realizar los siguientes análisis. En la **figura 11** se muestra el fragmento que alineó entre ambas secuencias marcado en color azul y se complementó con la secuencia de referencia para obtener toda la región codificante de la subunidad HA1.



**Figura 11. Secuencia 1037.4 correspondiente a la región codificante de la subunidad HA1.** Se muestra de color azul los segmentos añadidos de la secuencia de referencia MK630778.1 para obtener la región que codifica para la subunidad HA1 y de color verde el fragmento amplificado correspondiente a la muestra 1037.4

Una vez que se obtuvo la secuencia 1037.4 con la región codificante completa, se alinearon ambas secuencias y se encontraron cinco cambios nucleotídicos entre ellas. Estos cambios se encontraron en los nucleótidos 409, 516, 573, 605 y 702 (**figura 12**)

Consenso	ATGRAGGCAATACTAGTAGTTCTGCTGTATACATTTCACACCGCAAAATGACAGACACATTATGTATAGTTTATCATGCGAAACAATTCAACAGACACTGTAGACACAGTACTAGAAAAGATGTAAACGTA	129
MK630778.1	ATGAAGGCAATACTAGTAGTTCTGCTGTATACATTTCACACCGCAAAATGACAGACACATTATGTATAGTTTATCATGCGAAACAATTCAACAGACACTGTAGACACAGTACTAGAAAAGATGTAAACGTA	129
1037.4	ATGRAGGCAATACTAGTAGTTCTGCTGTATACATTTCACACCGCAAAATGACAGACACATTATGTATAGTTTATCATGCGAAACAATTCAACAGACACTGTAGACACAGTACTAGAAAAGATGTAAACGTA	129
Consenso	ACACACTCTGTTAATCTCTGGAAGACAAGCATAACGGAAAACTATGCAAACTAAGAGGGGTAGCCCCATTGCATTGGGTAAATGTAACATTGCTGGCTGGATCCTGGGAAATCCAGAGTGTGAATCA	258
MK630778.1	ACACACTCTGTTAATCTCTGGAAGACAAGCATAACGGAAAACTATGCAAACTAAGAGGGGTAGCCCCATTGCATTGGGTAAATGTAACATTGCTGGCTGGATCCTGGGAAATCCAGAGTGTGAATCA	258
1037.4	ACACACTCTGTTAATCTCTGGAAGACAAGCATAACGGAAAACTATGCAAACTAAGAGGGGTAGCCCCATTGCATTGGGTAAATGTAACATTGCTGGCTGGATCCTGGGAAATCCAGAGTGTGAATCA	258
Consenso	CTCTCCACAGCAAGATCATGGTCTACATTGTGGAAACATCTAATTCAGACAATGGAACGTGTTACCCAGGAGACTTCATCAATTATGAGGAGCTAAGAGAGCAATTGAGCTCAGTGCATCATTGGAA	387
MK630778.1	CTCTCCACAGCAAGATCATGGTCTACATTGTGGAAACATCTAATTCAGACAATGGAACGTGTTACCCAGGAGACTTCATCAATTATGAGGAGCTAAGAGAGCAATTGAGCTCAGTGCATCATTGGAA	387
1037.4	CTCTCCACAGCAAGATCATGGTCTACATTGTGGAAACATCTAATTCAGACAATGGAACGTGTTACCCAGGAGACTTCATCAATTATGAGGAGCTAAGAGAGCAATTGAGCTCAGTGCATCATTGGAA	387
Consenso	AGGTTTGAATATTCACAAAAGCAAGTTCATGGCCTAATCTGACTCGAACAAAGGTGTAAACGGCAGCATGTCTCACGCTGGAGCAAAAAGTCTCTACAAAACCTTGATATGGCTGGTAAAAAAG	516
MK630778.1	AGGTTTGAATATTCACAAAAGCAAGTTCATGGCCTAATCTGACTCGAACAAAGGTGTAAACGGCAGCATGTCTCACGCTGGAGCAAAAAGTCTCTACAAAACCTTGATATGGCTGGTAAAAAAG	516
1037.4	AGGTTTGAATATTCACAAAAGCAAGTTCATGGCCTAATCTGACTCGAACAAAGGTGTAAACGGCAGCATGTCTCACGCTGGAGCAAAAAGTCTCTACAAAACCTTGATATGGCTGGTAAAAAAG	516
Consenso	AATTCATACCCAAAGCTCAACCAAACTACATTATGATAAAGGGAAGAGTCCCTGCTGTGGGGCATTCAACCATCCACCTACTGCTGACCAACAAAGTCTCTATCAGAATGCAGATGCATAT	645
MK630778.1	AATTCATACCCAAAGCTCAACCAAACTACATTATGATAAAGGGAAGAGTCCCTGCTGTGGGGCATTCAACCATCCACCTACTGCTGACCAACAAAGTCTCTATCAGAATGCAGATGCATAT	645
1037.4	AATTCATACCCAAAGCTCAACCAAACTACATTATGATAAAGGGAAGAGTCCCTGCTGTGGGGCATTCAACCATCCACCTACTGCTGACCAACAAAGTCTCTATCAGAATGCAGATGCATAT	645
Consenso	GTGTTTGTGGGGACATCAAGATACAGCAAGAAGTTCAGCCCGAATAGCAACAACCCAAAGTGAGGGATCAAGAAAGGAGAACTAATTACTGGACACTAGTAGACCCGGAGACAAAATAACA	774
MK630778.1	GTGTTTGTGGGGACATCAAGATACAGCAAGAAGTTCAGCCCGAATAGCAACAACCCAAAGTGAGGGATCAAGAAAGGAGAACTAATTACTGGACACTAGTAGACCCGGAGACAAAATAACA	774
1037.4	GTGTTTGTGGGGACATCAAGATACAGCAAGAAGTTCAGCCCGAATAGCAACAACCCAAAGTGAGGGATCAAGAAAGGAGAACTAATTACTGGACACTAGTAGACCCGGAGACAAAATAACA	774
Consenso	TTGGAAGCAACTGGAAATCTAGTGGTACCGAGATATGCATTCACAATGGAAAGAAATGCTGGATCTGGTATTATCATTTCAGATACACCAAGTCCACGATTGCAATACAACCTGTGACACCCCGAGGGT	903
MK630778.1	TTGGAAGCAACTGGAAATCTAGTGGTACCGAGATATGCATTCACAATGGAAAGAAATGCTGGATCTGGTATTATCATTTCAGATACACCAAGTCCACGATTGCAATACAACCTGTGACACCCCGAGGGT	903
1037.4	TTGGAAGCAACTGGAAATCTAGTGGTACCGAGATATGCATTCACAATGGAAAGAAATGCTGGATCTGGTATTATCATTTCAGATACACCAAGTCCACGATTGCAATACAACCTGTGACACCCCGAGGGT	903
Consenso	GCTATAAACACCCAGCCTCCCATTTTCAGAAATGTACATCCGATCACAATGGAAAGAAATGCTGGATCTGGTATTATCATTTCAGATACACCAAGTCCACGATTGCAATACAACCTGTGACACCCCGAGGGT	1032
MK630778.1	GCTATAAACACCCAGCCTCCCATTTTCAGAAATGTACATCCGATCACAATGGAAAGAAATGCTGGATCTGGTATTATCATTTCAGATACACCAAGTCCACGATTGCAATACAACCTGTGACACCCCGAGGGT	1032
1037.4	GCTATAAACACCCAGCCTCCCATTTTCAGAAATGTACATCCGATCACAATGGAAAGAAATGCTGGATCTGGTATTATCATTTCAGATACACCAAGTCCACGATTGCAATACAACCTGTGACACCCCGAGGGT	1032

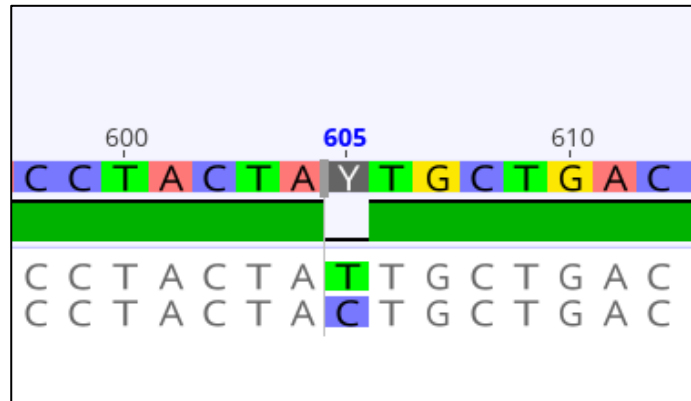
**Figura 12. Alineamiento de la región codificante de las secuencias MK630778.1 y 1037.4.** Se realizó un alineamiento múltiple para poder visualizar la similitud entre las secuencias, donde se encontraron cinco sitios con un cambio de base nitrogenada marcados en recuadros rojos.

Se generaron las secuencias aminoacídicas de las secuencias MK630778.1 y 1037.4 (**figura 13**) para analizar si los cambios nucleotídicos se ven reflejados en cambios de aminoácidos, por lo que se alinearon ambas secuencias y solo se encontró un cambio de aminoácido en la posición 202 siendo un cambio de Isoleucina por Treonina, dado por el cambio de nucleótido en la posición 605 (**figura 14**).

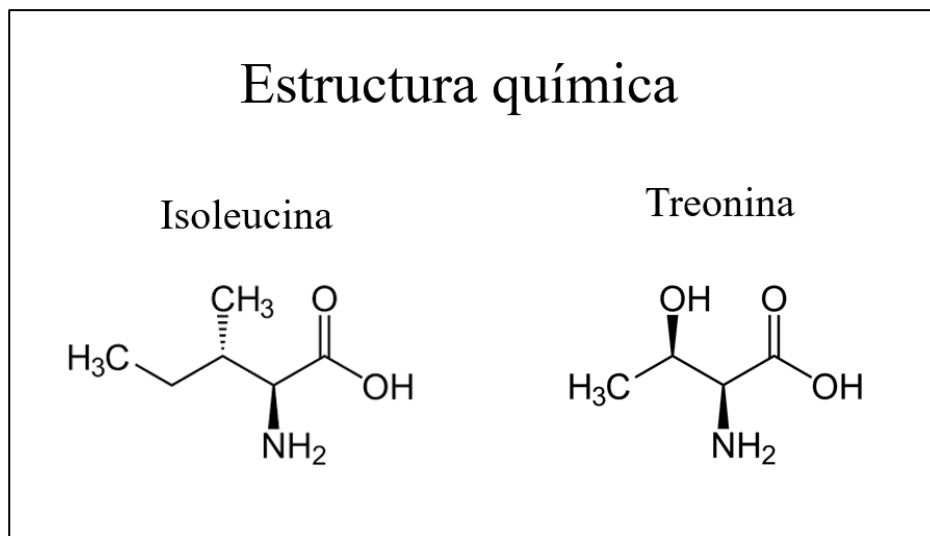
Consenso	MKAILVLLYFTTANADTLCIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLEDKHNGLCKLGRVAPLHLGKNCNIAGWILGNPECESLSTA	90
MK630778.1	MKAILVLLYFTTANADTLCIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLEDKHNGLCKLGRVAPLHLGKNCNIAGWILGNPECESLSTA	90
1037.4	MKAILVLLYFTTANADTLCIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLEDKHNGLCKLGRVAPLHLGKNCNIAGWILGNPECESLSTA	90
Consenso	RSWSYIVETSNSDNGTCYPGDFINYEELREQLSSVSSFERFEIFPKASSWPNHDSNKGVTAACP HAGAKSFYKNIWLWVKKGNYPKLNQ	180
MK630778.1	RSWSYIVETSNSDNGTCYPGDFINYEELREQLSSVSSFERFEIFPKASSWPNHDSNKGVTAACP HAGAKSFYKNIWLWVKKGNYPKLNQ	180
1037.4	RSWSYIVETSNSDNGTCYPGDFINYEELREQLSSVSSFERFEIFPKASSWPNHDSNKGVTAACP HAGAKSFYKNIWLWVKKGNYPKLNQ	180
Consenso	TYINDRGKEVLVLWGIHHPPTADQQLSYQNADAYVFGVTSRYSKFKPEIATRPKVRDQEGRMNYYWTLVEPGDKITFEATGNLVVPRY	270
MK630778.1	TYINDRGKEVLVLWGIHHPPTADQQLSYQNADAYVFGVTSRYSKFKPEIATRPKVRDQEGRMNYYWTLVEPGDKITFEATGNLVVPRY	270
1037.4	TYINDRGKEVLVLWGIHHPPTADQQLSYQNADAYVFGVTSRYSKFKPEIATRPKVRDQEGRMNYYWTLVEPGDKITFEATGNLVVPRY	270
Consenso	AFTMERNAGSGIIISDTPVHDCNTTCQTPEGAINSTLSPFNQVHPITIGKCPKYVKSTKLRLATGLRNVPSIQSR	344
MK630778.1	AFTMERNAGSGIIISDTPVHDCNTTCQTPEGAINSTLSPFNQVHPITIGKCPKYVKSTKLRLATGLRNVPSIQSR	344
1037.4	AFTMERNAGSGIIISDTPVHDCNTTCQTPEGAINSTLSPFNQVHPITIGKCPKYVKSTKLRLATGLRNVPSIQSR	344

**Figura 13. Alineamiento de la región codificante de las secuencias aminoacídicas MK630778.1**

y 1037.4. En el recuadro color rojo se muestra el sitio donde se encuentra el cambio de aminoácido entre las secuencias como resultado del cambio de nucleótido visualizado en el alineamiento de las secuencias.



**Figura 14. Región de sustitución de aminoácido en las secuencias aminoacídicas MK630778.1 y 1037.4** Se muestra un acercamiento del sitio 605 en el que el cambio de base nitrogenada de timina por citosina genera el cambio de aminoácidos en la posición 202 de la secuencia aminoacídica.

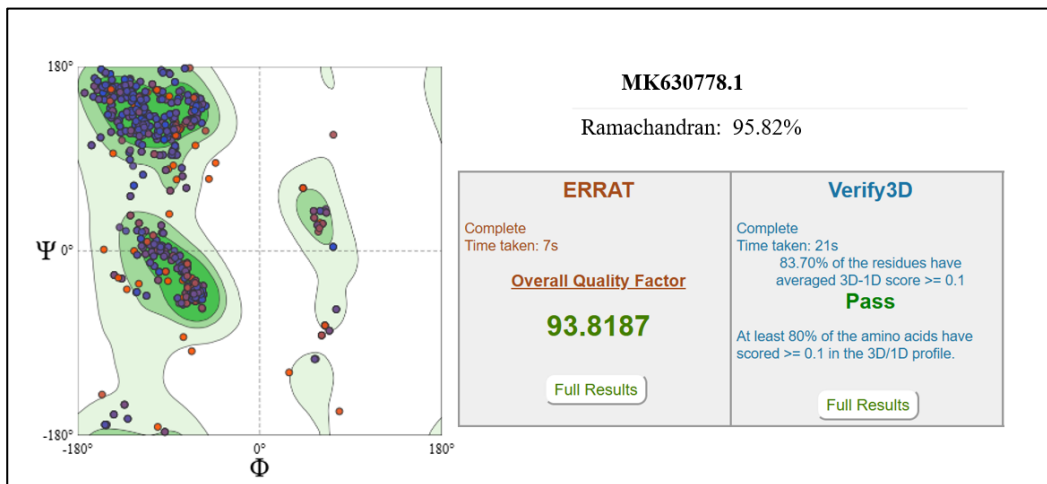


**Figura 15. Estructuras químicas de los aminoácidos presentes en la posición 202, de las secuencias MK630778.1 y 1037.4.** Se muestra la estructura de ambos aminoácidos, en el que se aprecia que en la posición del grupo -CH<sub>3</sub> de la Isoleucina hay un grupo -OH en el aminoácido Treonina.

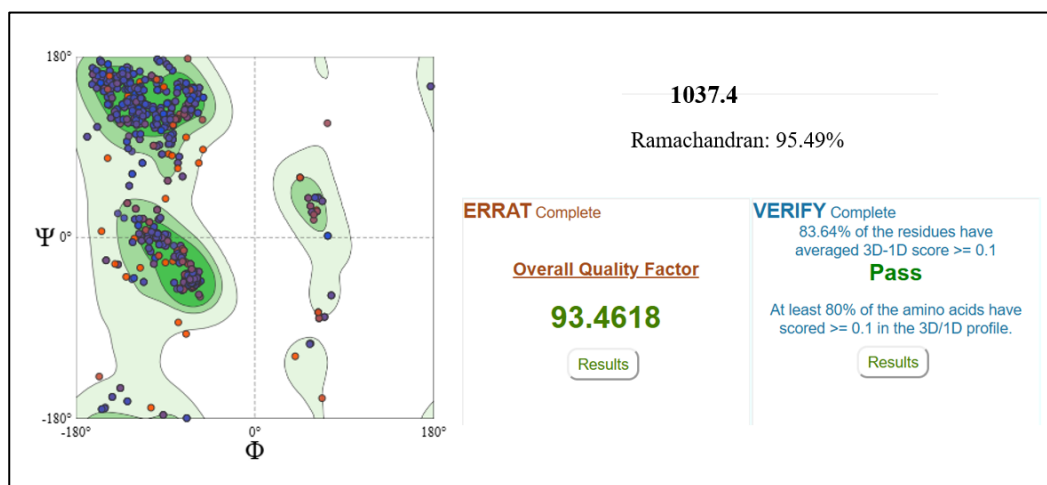
### 7.6 Modelo de las estructuras de las secuencias 1037.4 y MK630778.1

Utilizando la plataforma de SwissModel, se introdujeron las secuencias aminoacídicas de las secuencias de las muestras MK630778.1 y 1037.4. Posteriormente para evaluar la calidad

de las estructuras se utilizó la herramienta de SAVES que contiene los análisis de calidad de ERRAT y Verify3D (**figura 16**), mientras que los gráficos de Ramachandran se obtuvieron de SwissModel (**figura 17**).



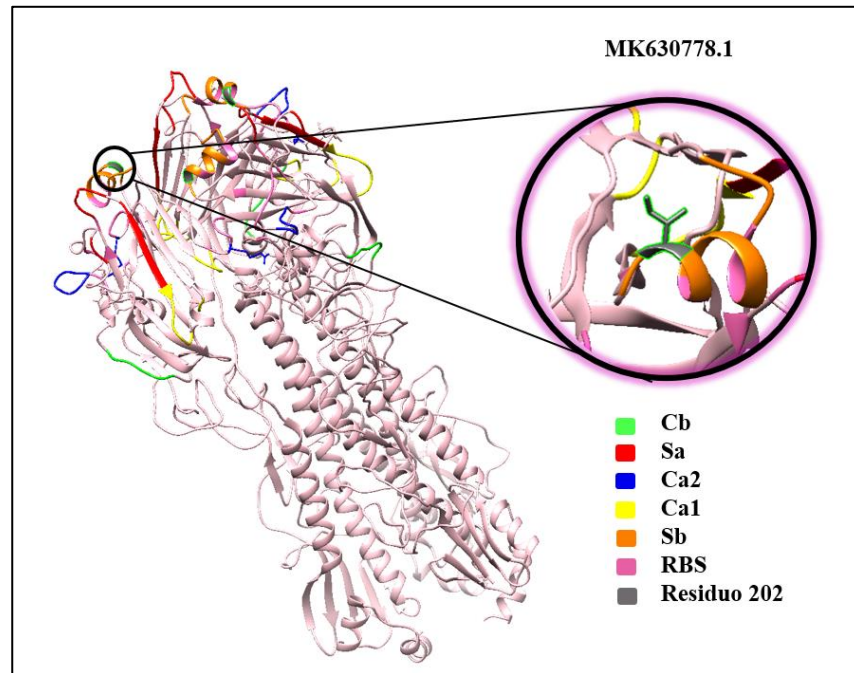
**Figura 16. Valores de calidad del modelo generado para la estructura proteica de la secuencia MK630778.1** Los análisis de calidad de ERRAT y Verify3D fueron realizados en el servidor SAVES versión 6.1, mientras que el gráfico de Ramachandran fue extraído de SWISSMODEL durante el modelado de la estructura de la secuencia de referencia.



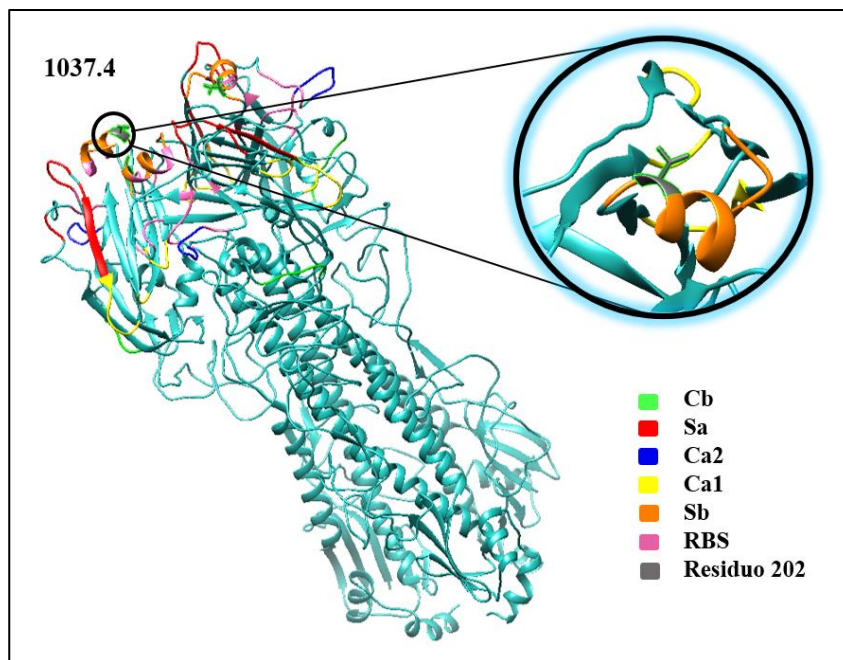
**Figura 17. Valores de calidad del modelo generado para la estructura proteica de la secuencia 1037.4** Los análisis de calidad de ERRAT y Verify3D fueron realizados en el servidor SAVES versión 6.1, mientras que el gráfico de Ramachandran fue extraído de SWISSMODEL durante el modelado de la estructura de la secuencia 1037.4.

## 7.7 Análisis estructural y de características bioquímicas

Los modelos ya validados en su calidad estructural fueron visualizados con Chimera X, donde se marcaron sitios importantes como el sitio 202 donde se encontró el cambio de aminoácido, el sitio de unión a receptor y los 5 sitios antigénicos de la Hemaglutinina tanto de MK630778.1 (**figura 18**) como de 1037.4 (**figura 19**).

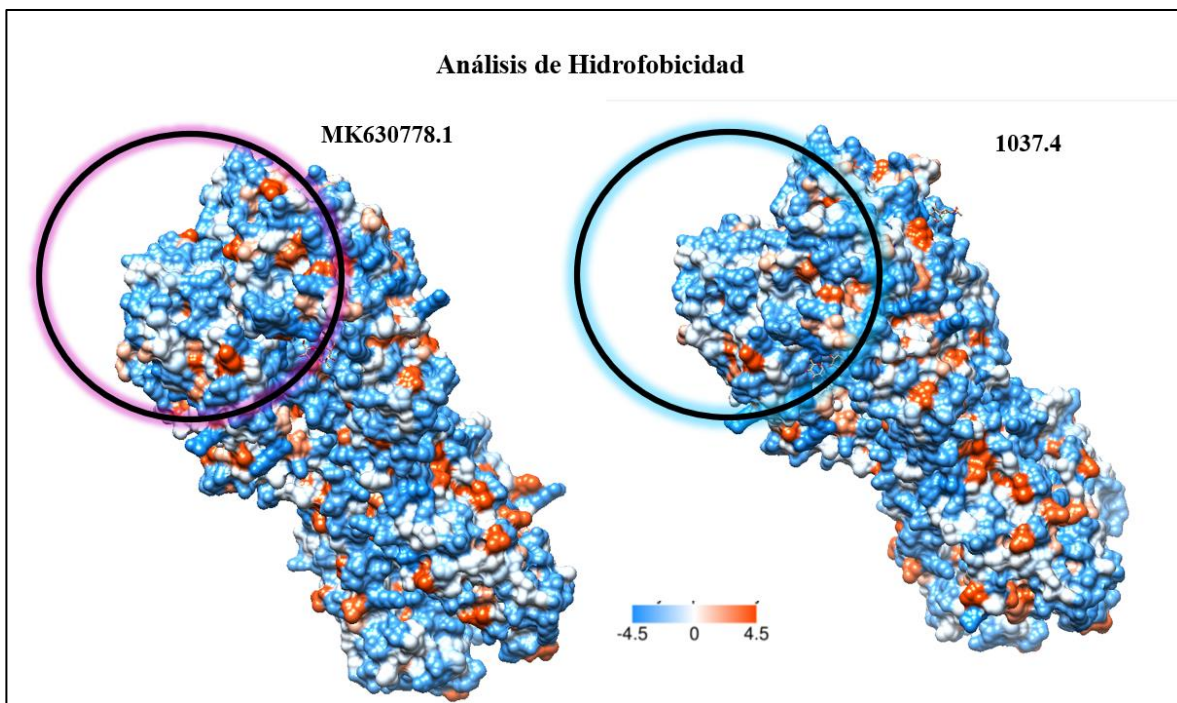


**Figura 18 . Modelo tridimensional de la secuencia MK630778.1 y regiones importantes de la proteína.** Se marcan de colores los sitios antigénicos de la proteína (Cb, Sa, Ca2, Ca1 y Sb) y el sitio de unión al receptor (RBS), además de color gris se muestra el residuo 202 correspondiente a Isoleucina.

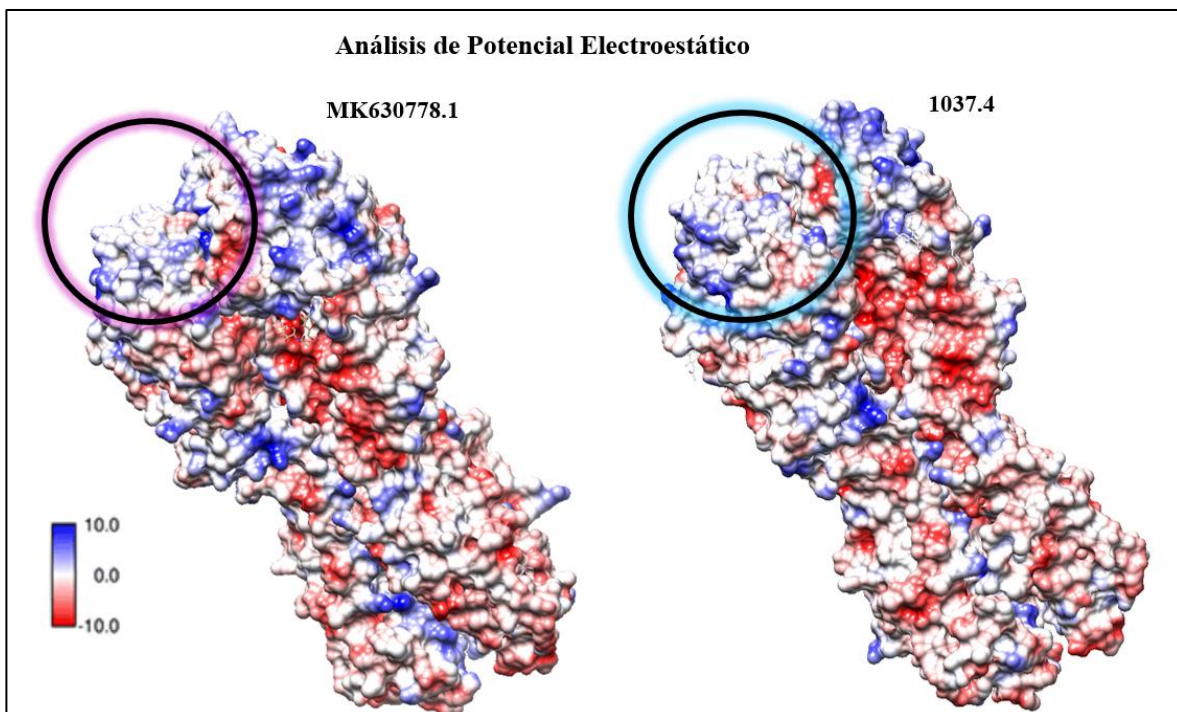


**Figura 19. Modelo tridimensional de la secuencia 1037.4 y regiones importantes de la proteína.** Se marcan de colores los sitios antigénicos de la proteína (Cb, Sa, Ca2, Ca1 y Sb) y el sitio de unión al receptor (RBS), además de color gris se muestra el residuo 202 correspondiente a Treonina para la secuencia 1037.4.

Además, se analizaron las secuencias MK630778.1 y 1037.4 en ChimeraX, donde se generó el análisis de hidrofobicidad de ambas proteínas para apreciar los posibles cambios dados por el cambio de aminoácido encontrado entre ambas secuencias (**figura 20**). Seguido del análisis de potencial electrostático de las proteínas generado en el mismo software (**figura 21**).



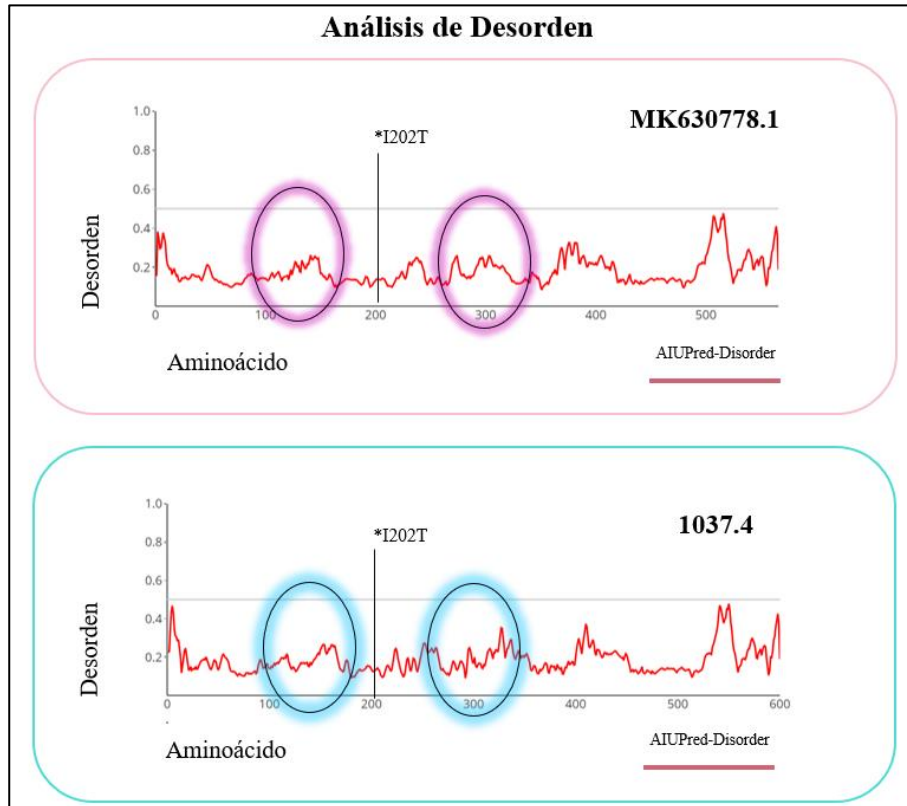
**Figura 20. Análisis de hidrofobicidad de las estructuras proteicas de las secuencias MK630778.1 y 1037.4** Marcados en círculos se muestran las regiones donde se ubica el residuo 202 en el que se encontró el cambio de aminoácido entre las secuencias.



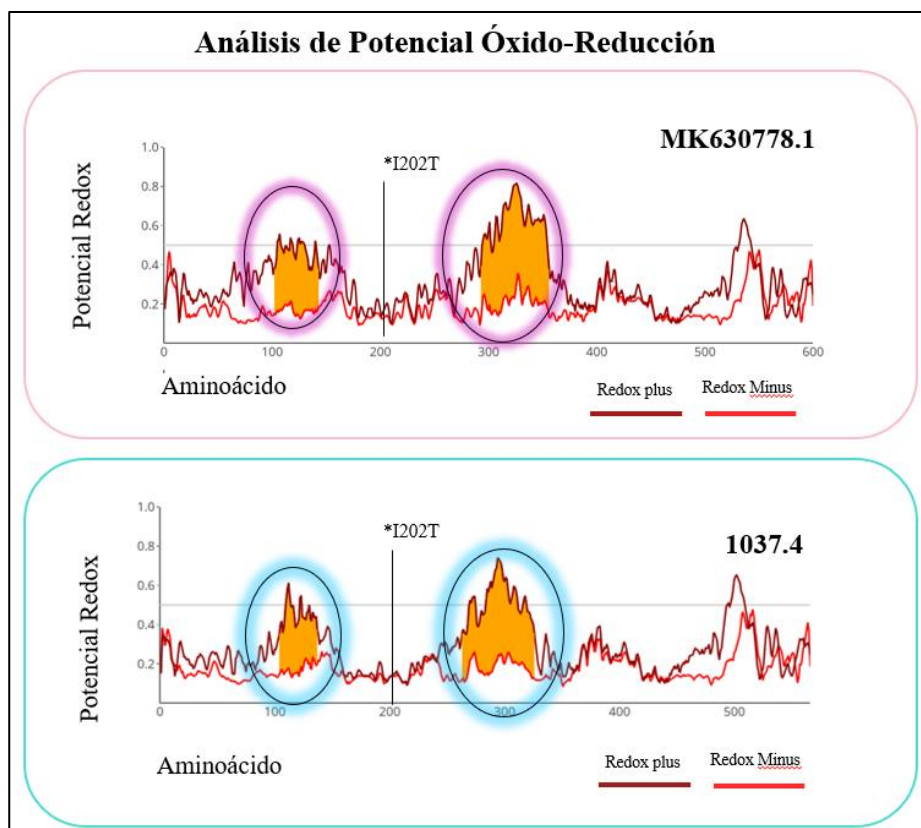
**Figura 21. Análisis de potencial eléctrico de las estructuras proteicas de las secuencias**

**MK630778.1** y **1037.4** Marcados en círculos se muestran las regiones donde se ubica el residuo 202 en el que se encontró el cambio de aminoácido entre las secuencias.

Para concluir los análisis, se generaron los análisis de desorden y de óxido reducción utilizando la herramienta de AIUPred (**figuras 22 y 23**).



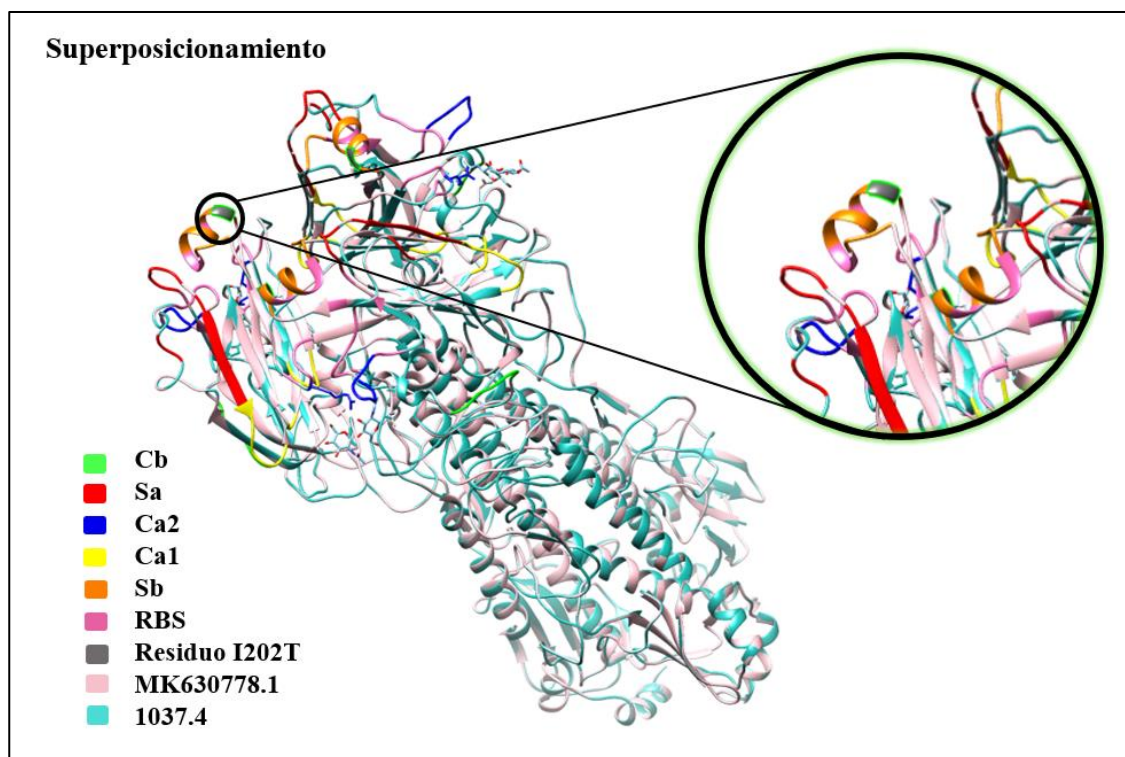
**Figura 22. Análisis de Desorden de las estructuras proteicas de las secuencias MK630778.1 y 1037.4** Marcados en círculos se muestran las regiones donde se observan cambios entre la secuencia de referencia con la secuencia 1037.4 en cuanto al desorden de los residuos de aminoácidos.



**Figura 23.** Análisis de potencial óxido-reducción de las estructuras proteicas de las secuencias **MK630778.1** y **1037.4** Marcados en círculos se muestran las regiones donde se observan cambios entre la secuencia de referencia con la secuencia 1037.4 en cuanto al potencial de óxido reducción de los residuos de aminoácidos. De color rojo oscuro se muestra la posibilidad de que el resultado de la reacción de óxido reducción termine en un valor de energía positivo, mientras que de color rojo claro se muestra la posibilidad de que termine con un valor de energía negativo.

### 7.8 Superposicionamiento de las secuencias 1037.4 y MK630778.1

Los modelos de las secuencias MK630778.1 y 1037.4 fueron acoplados utilizando un superposicionamiento de las estructuras de ambas secuencias para comparar posibles cambios entre ellas (**figura 24**).



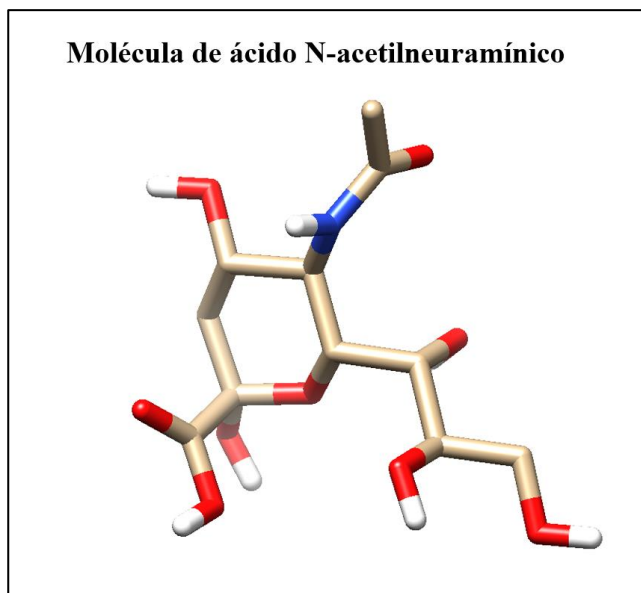
**Figura 24. Superposicionamiento de las estructuras proteicas de las secuencias MK630778.1 y 1037.4** Se marcan de colores los sitios antigénicos de la proteína (Cb, Sa, Ca2, Ca1 y Sb) y el sitio de unión al receptor (RBS), además de color gris se muestra el residuo 202 correspondiente a la mutación I202T, y de color rosa claro es la estructura correspondiente a la muestra de referencia, mientras que de color azul claro se muestra la secuencia 1037.4.

### 7.9 Acoplamiento molecular Proteína-Ligando

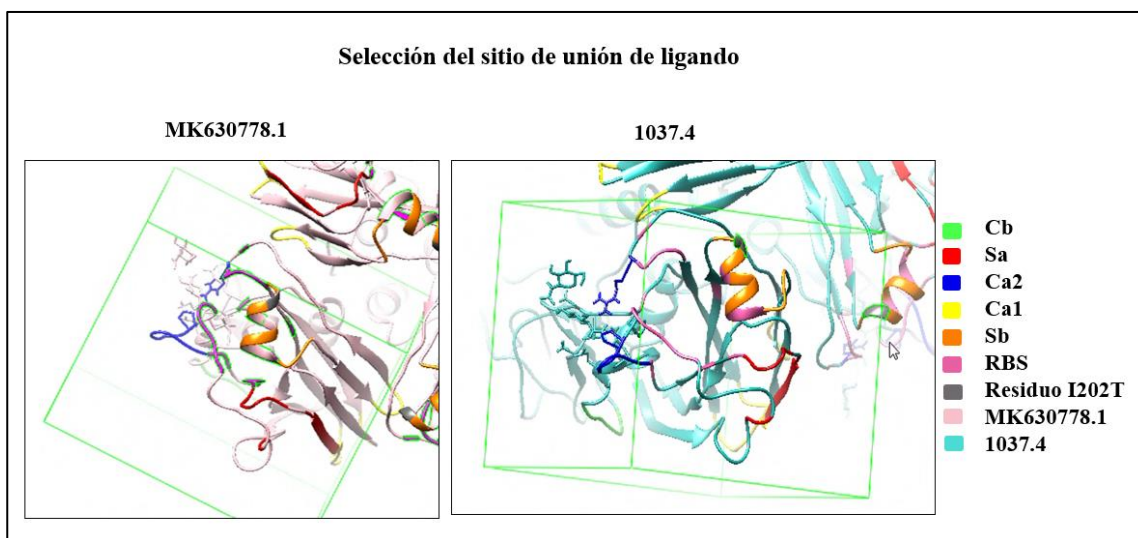
Se realizó la selección de la molécula de ácido N-acetilneuramínico, que se utilizó como ligando para el acoplamiento molecular, del cual se descargó la estructura del ligando en la página de Pubchem, se seleccionó el código de sistema simplificado de entrada de línea de entrada molecular (SMILES) de la molécula (CC(=O)N[C@@H]1[C@H](CC(O[C@H]1[C@@H]([C@@H](CO)O)O)(C(=O)O)O)O) y se visualizó en ChimeraX, donde se minimizó la estructura y se configuró como ligando para los ensayos de acoplamiento utilizando AutodockTools (**Figura 25**).

Por otra parte, los modelos estructurales de las secuencias MK630778.1 y 1037.4 fueron visualizados y minimizados en ChimeraX, posteriormente a cada una de las moléculas se le adjuntó el archivo del ligando en formato Banco de datos de proteínas (PDB) por separado

y utilizando el programa Autodock Vina en ChimeraX, se realizó la selección de las moléculas, en la cual las secuencias MK630778.1 y 1037.4 se seleccionaron como receptor y la molécula de ácido N-acetilneuramínico como ligando. Para realizar el acoplamiento molecular se delimitó un área en las secuencias de las proteínas de la hemaglutinina para realizar la búsqueda en las zonas donde el ligando pudiera acoplarse, por lo que dentro de la zona delimitada se colocó el sitio de unión al receptor (**Figura 26**).



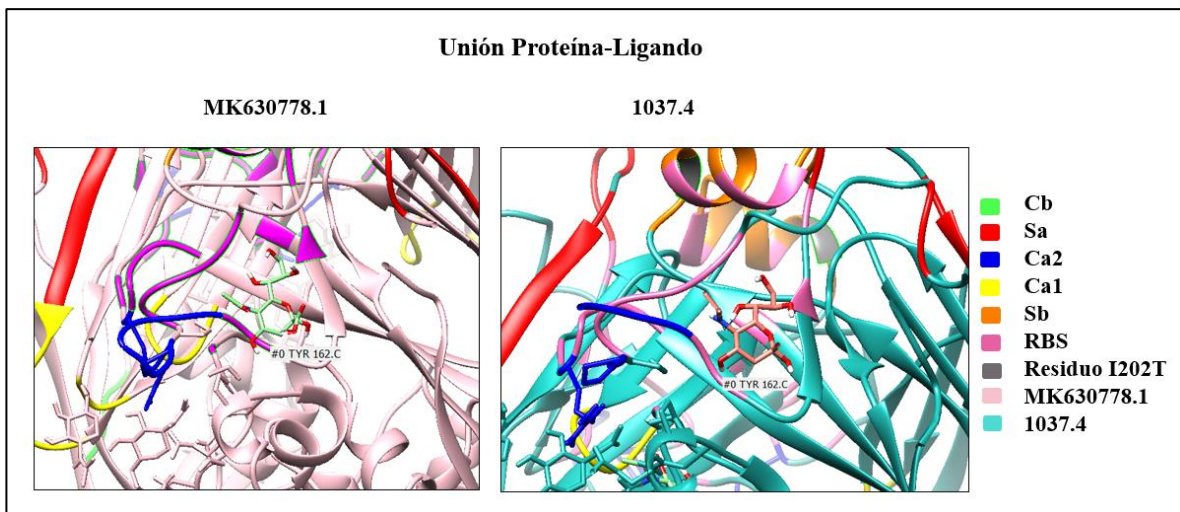
**Figura 25. Molécula de ácido N-acetilneuramínico extraída de PubChem.** La estructura fue extraída en su descriptor Smiles y visualizada en ChimeraX donde se minimizó la estructura con el fin de obtener mayor estabilidad en la molécula.



**Figura 26. Selección del sitio de acoplamiento molecular en las estructuras proteicas de las secuencias MK630778.1 y 1037.4** Se marcan de colores los sitios antigénicos de la proteína (Cb,

Sa, Ca2, Ca1 y Sb) y el sitio de unión al receptor (RBS), además de color gris se muestra el residuo 202 correspondiente a la mutación I202T, y de color rosa claro es la estructura correspondiente a la muestra de referencia, mientras que de color azul claro se muestra la secuencia 1037.4. De color verde se encuentran cajas que encierran al sitio de unión al receptor, la cual delimita la zona en la que el acoplamiento molecular realiza su búsqueda de acoplamiento.

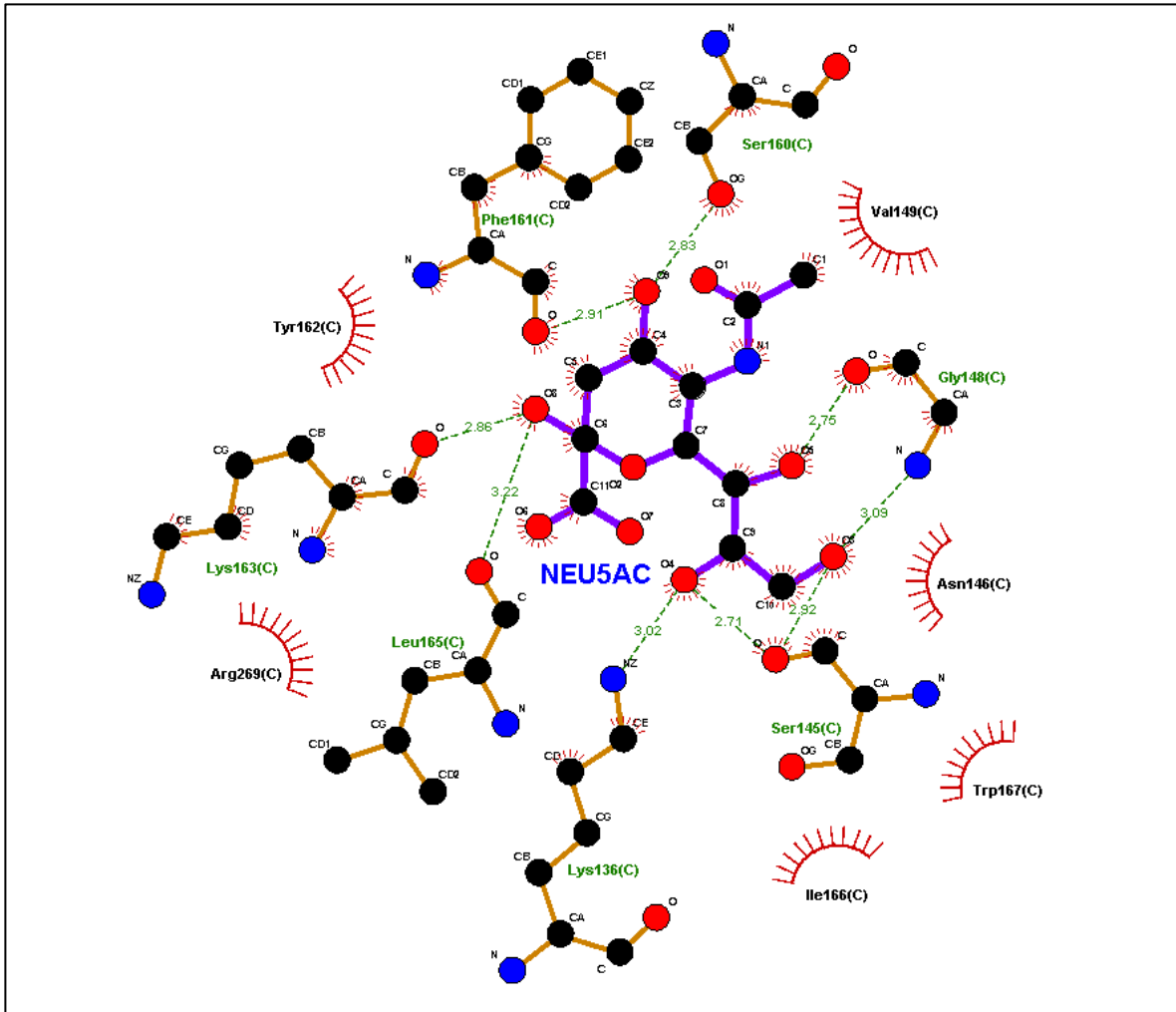
Como resultado del acoplamiento molecular se obtuvo que el ligando se unió a la proteína de la Hemaglutinina cercano a los residuos de aminoácidos 161 y 162, los cuales son parte del sitio de unión al receptor, mientras que para la estructura de referencia se obtuvo un Score de afinidad de  $-6.939$  kcal/mol, para la estructura de la secuencia 1037.4 el score fue de  $-6.949$  kcal/mol (**figura 27**).



**Figura 27. Acoplamiento molecular de las estructuras proteicas de las secuencias MK630778.1 y 1037.4 y del ácido N-acetilneuramínico.** Se marcan de colores los sitios antigénicos de la proteína (Cb, Sa, Ca2, Ca1 y Sb) y el sitio de unión al receptor (RBS), además de color gris se muestra el residuo 202 correspondiente a la mutación I202T, y de color rosa claro es la estructura correspondiente a la muestra de referencia, mientras que de color azul claro se muestra la secuencia 1037.4, se muestra en el residuo 162, la zona en la que el ligando fue acoplado por el programa ChimeraX al realizar el acoplamiento molecular.

Con el fin de poder visualizar de una mejor manera las interacciones que ocurren entre el ligando y la hemaglutinina, se utilizó el programa de LigPlus tanto con el acoplamiento molecular correspondiente a la secuencia de referencia (**figura 28**) como a la secuencia de la muestra 1037.4 (**Figura 29**). Asimismo, en la **figura 30** se aprecia la leyenda de los

elementos visuales que aparecen en el análisis de LigPlus.



**Figura 28. Visualización de la interacción proteína-ligando en la estructura de referencia.** Se puede visualizar que hay interacción con los residuos 136, 145, 148, 160, 161, 163 y 165 mediante enlaces de hidrógeno que interactúan con residuos del ligando. Por otro lado los residuos 146, 149, 162, 166, 167 y 269 están involucrados en el contacto hidrofóbico.



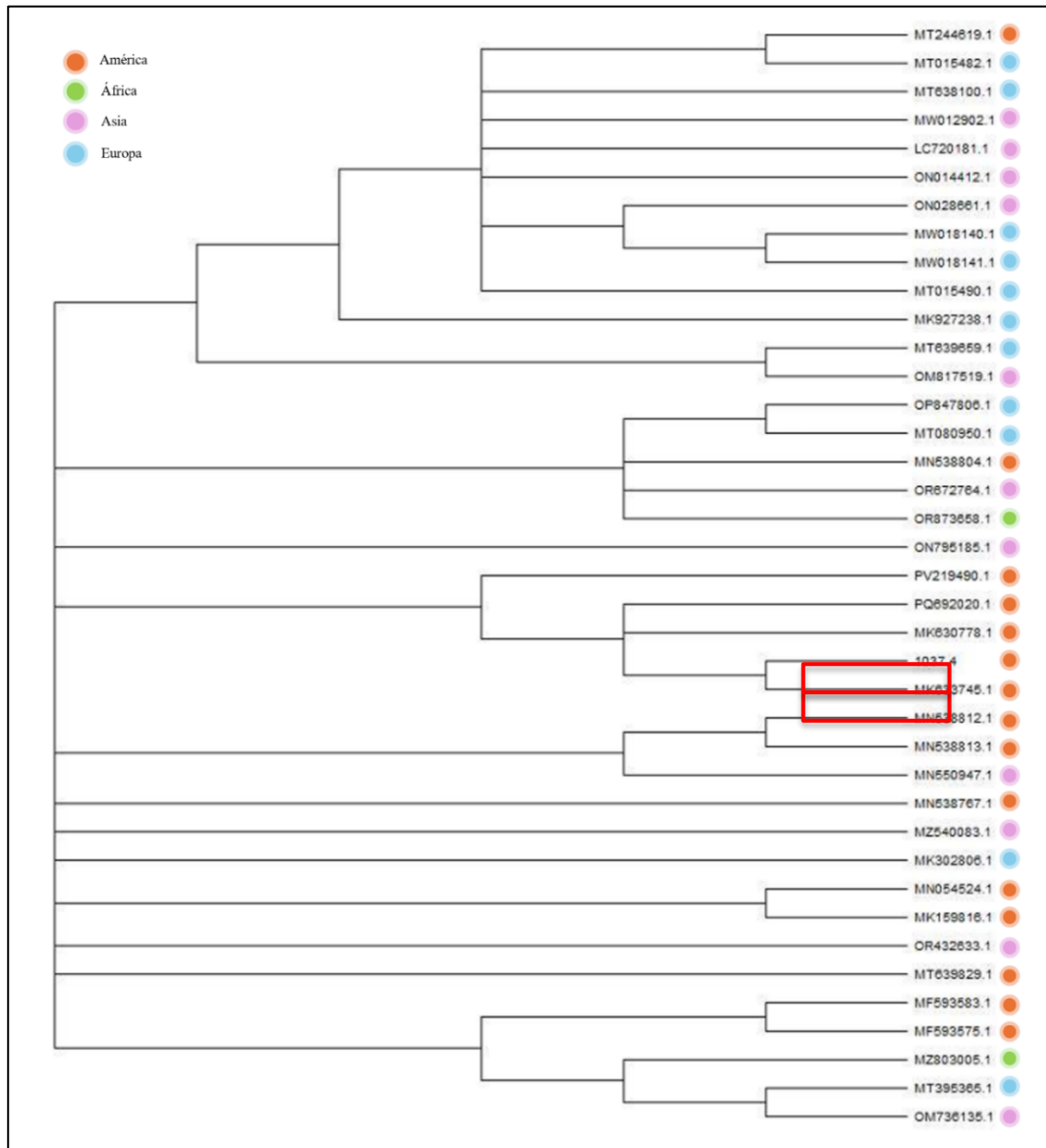
## 7.10 Árbol filogenético

Utilizando el programa GENEIOUS se generó el árbol filogenético en el cual se analizaron poco más de 35 secuencias nucleotídicas de diferentes países y continentes, teniendo como criterios de inclusión pertenecer al Virus de influenza A, de la proteína HA, obtenidas en la temporada 2018-2019 y aisladas de huésped humano (**figura 31**).

Virus	Subtipo	Segmento	Huesped	Año de recolección	Continente	Ubicación Geográfica	Número de acceso
Influenza A	H1N1	4 (HA)	<i>Homo sapiens</i>	2019	América	CHILE, SANTIAGO	MN054524.1
Influenza A	H1N1	4 (HA)	<i>Homo sapiens</i>	2018	América	CHILE	MK159816.1
Influenza A	H1N1	4 (HA)	<i>Homo sapiens</i>	2018	América	NICARAGUA	PV219490.1
Influenza A	H1N1	4 (HA)	<i>Homo sapiens</i>	2019	América	WASHINGTON	PQ692020.1
Influenza A	H1N1	4 (HA)	<i>Homo sapiens</i>	2019	América	TEXAS	MT639829.1
Influenza A	H1N1	4 (HA)	<i>Homo sapiens</i>	2019	América	MAINE	MT244619.1
Influenza A	H1N1	4 (HA)	<i>Homo sapiens</i>	2018	América	MEXICO	MK633745.1
Influenza A	H1N1	4 (HA)	<i>Homo sapiens</i>	2018	América	MEXICO	MF593583.1
Influenza A	H1N1	4 (HA)	<i>Homo sapiens</i>	2018	América	MEXICO	MF593575.1
Influenza A	H1N1	4 (HA)	<i>Homo sapiens</i>	2018	América	COLUMBIA	MN538767.1
Influenza A	H1N1	4 (HA)	<i>Homo sapiens</i>	2018	América	ONTARIO	MN538804.1
Influenza A	H1N1	4 (HA)	<i>Homo sapiens</i>	2018	América	QUEBEC	MN538812.1
Influenza A	H1N1	4 (HA)	<i>Homo sapiens</i>	2018	América	ALBERTA	MN538813.1
Influenza A	H1N1	4 (HA)	<i>Homo sapiens</i>	2018	Europa	ALEMANIA	OP847806.1
Influenza A	H1N1	4 (HA)	<i>Homo sapiens</i>	2019	Europa	ITALIA	MT080950.1
Influenza A	H1N1	4 (HA)	<i>Homo sapiens</i>	2019	Europa	PAISES BAJOS	MT395365.1
Influenza A	H1N1	4 (HA)	<i>Homo sapiens</i>	2019	Europa	RUSIA, MOSCÚ	MW018140.1
Influenza A	H1N1	4 (HA)	<i>Homo sapiens</i>	2019	Europa	RUSIA, PENZA	MW018141.1
Influenza A	H1N1	4 (HA)	<i>Homo sapiens</i>	2019	Europa	BELGICA	MT638100.1
Influenza A	H1N1	4 (HA)	<i>Homo sapiens</i>	2019	Europa	UK, INGLATERRA	MT639659.1
Influenza A	H1N1	4 (HA)	<i>Homo sapiens</i>	2019	Europa	RUSIA, VLADIVOSTOK	MT015482.1
Influenza A	H1N1	4 (HA)	<i>Homo sapiens</i>	2019	Europa	RUSIA, YAROSLAVL	MT015490.1
Influenza A	H1N1	4 (HA)	<i>Homo sapiens</i>	2019	Europa	ESPAÑA	MK927238.1
Influenza A	H1N1	4 (HA)	<i>Homo sapiens</i>	2018	Europa	FRANCIA	MK302806.1
Influenza A	H1N1	4 (HA)	<i>Homo sapiens</i>	2019	Asia	SHANGHAI	OR432633.1
Influenza A	H1N1	4 (HA)	<i>Homo sapiens</i>	2018	Asia	URUMQI	MN550947.1
Influenza A	H1N1	4 (HA)	<i>Homo sapiens</i>	2019	Asia	HAINAN	ON795185.1
Influenza A	H1N1	4 (HA)	<i>Homo sapiens</i>	2018	Asia	TURQUIA	OR672764.1
Influenza A	H1N1	4 (HA)	<i>Homo sapiens</i>	2019	Asia	INDIA KERALA	ON014412.1
Influenza A	H1N1	4 (HA)	<i>Homo sapiens</i>	2019	Asia	ARABIA SAUDITA	OM817519.1
Influenza A	H1N1	4 (HA)	<i>Homo sapiens</i>	2018	Asia	JAPÓN FUKUSHIMA	LC720181.1
Influenza A	H1N1	4 (HA)	<i>Homo sapiens</i>	2019	Asia	IRAN	ON028661.1
Influenza A	H1N1	4 (HA)	<i>Homo sapiens</i>	2018	Asia	KASAJAZTAN	OM736135.1
Influenza A	H1N1	4 (HA)	<i>Homo sapiens</i>	2019	Asia	INDIA	MW012902.1
Influenza A	H1N1	4 (HA)	<i>Homo sapiens</i>	2018	Asia	IRAN SHIRAZ	MZ540083.1
Influenza A	H1N1	4 (HA)	<i>Homo sapiens</i>	2018	Africa	SUDAFRICA	MZ803005.1
Influenza A	H1N1	4 (HA)	<i>Homo sapiens</i>	2018	Africa	KENIA	OR873658.1
Influenza A	H1N1	4 (HA)	<i>Homo sapiens</i>	2018	América	MEXICO	1037.4
Influenza A	H1N1	4 (HA)	<i>Homo sapiens</i>	2018	América	MEXICO	MK630778.1

**Figura 31. Secuencias de HA de diferentes países en el periodo de 2018-2019.** Se muestran los números de acceso correspondientes a secuencias de distintos continentes pertenecientes a la hemaglutinina del virus de influenza A(H1N1) en el periodo de 2018-2019 aislado de hospederos humanos.

El programa utilizado para la generación del árbol filogenético fue el programa MEGA 12, en el cual se seleccionó la búsqueda de parámetros de preferencia para el modelo de máxima similitud y posteriormente se aplicaron estos parámetros y ajustes (**figura 32**).



**Figura 32. Árbol filogenético de secuencias de HA de diferentes continentes y las secuencias de referencia MK630778.1 y 1037.4** De color naranja se muestran las secuencias pertenecientes al continente americano, de color azul al continente europeo, de color morado el continente asiático y de color verde las secuencias del continente africano. Además de rojo se encuentran marcadas las secuencias MK630778.1 y 1037.4

## 8.DISCUSIÓN

Partiendo de conocer la presencia del gen de la Hemaglutinina en todas las muestras del ensayo de la RT-PCR Multisegmento, se procedió a amplificar la subunidad HA1, siendo esta, una región de reconocimiento (Bravo, 2010), en este caso no todas las muestras de la temporada 2018-2019 presentaron la amplificación de la subunidad HA1, esto se puede deber a que, ya que el ARN siendo de cadena sencilla, a diferencia del ADN de doble cadena, es más inestable y su integridad se puede ver comprometida si es almacenado a  $-80^{\circ}\text{C}$  por más de un año. Además, el hecho de ser ARN implica una alta tasa de mutación por la introducción de cambios de nucleótidos durante la replicación del genoma. Por lo tanto son varios factores que pueden estar implicados en que no se haya podido confirmar la presencia de la subunidad HA1.

Una vez obtenida la subunidad HA1, se procedió a la amplificación de un fragmento menor de 339 pares de bases. Estos fragmentos fueron analizados por la técnica de SSCP, donde nos permite analizar cambios menores en la secuencia sin tener que secuenciar gran cantidad de muestras (Munguía, 2007), los patrones obtenidos fueron analizados para seleccionar a las muestras candidatas para la secuenciación.

La secuencia obtenida de la muestra 1037.4 mostró una buena calidad en su secuencia de acuerdo con el análisis del electroferograma, donde de acuerdo con Carr y colaboradores en 2009, en un resultado de buena calidad se puede ver un pico por base nucleotídica, lo que indica que los procesos de preparación y procesamiento de la muestra son eficientes, además de que la altura del pico es equivalente a la intensidad de la señal de la base. Los resultados del alineamiento entre la secuencia 1037.4 y la secuencia de referencia MK630778.1 mostraron que entre secuencias nucleotídicas hay una diferencia de 5 pares de bases, estas sustituciones de un solo nucleótido (SNP) pueden presentarse en el genoma con una frecuencia de una por cada 1000pb, y pueden cambiar los aminoácidos codificados, ser silenciosos o encontrarse en regiones no codificantes. Aunque algunos de estos cambios en la secuencia no hayan alterado la traducción de aminoácidos, es importante mencionar que pueden tener efectos en la actividad promotora o en la conformación del ARN mensajero o de las proteínas (Shastry B, 2009). Al analizar los cambios entre las secuencias aminoacídicas de la muestra 1037.4 y la muestra de referencia, se observó un solo cambio ubicado en el aminoácido 202, donde en la secuencia 1037.4 en esta posición se encuentra

una Treonina (T) dado por el codón ATT, mientras que para la secuencia MK630778.1 el aminoácido ubicado en esta posición es Isoleucina (I) dada por el codón ACT, lo cual corresponde al cambio nucleotídico previamente mencionado en la posición 605. Es importante recordar que los cambios en los aminoácidos pueden repercutir en las características bioquímicas y estructurales de una proteína, por lo que en los análisis de hidrofobicidad y de potencial electroestático, se hallaron pequeños cambios en la hidrofobicidad de la estructura, ya que en la escala de Kyte y Doolittle de hidrofobicidad que se utiliza para analizar las características fisicoquímicas de las proteínas en la bioinformática (Grasso *et al.*, 2016), la isoleucina tiene un valor de 4.5, mientras que la treonina de -0.7. lo cual a valores más cercanos a 0 muestran un color blanco, cercano a -4.5 color azul y a 4.5 color naranja, lo que concuerda con los resultados del análisis de hidrofobicidad donde observamos un cambio en los colores de la superficie de la proteína. En el análisis de potencial electroestático realizado en ChimeraX, se calcula el potencial electroestático según la ley de Coulomb, donde el color rojo indica un potencial negativo, el color blanco cercano al neutro y el color azul para un potencial positivo, y se refiere a la distribución de cargas eléctricas en la superficie, donde en nuestro resultado podemos observar que la zona cercana al sitio de cambio de aminoácido 202, aunque no se ve un cambio en la coloración en la región del sitio de la mutación I202T es importante mencionar que debido a que la treonina posee en su estructura un grupo -OH donde la isoleucina de la muestra de referencia tiene un grupo -CH<sub>3</sub>, tiene una posibilidad mayor de interactuar y crear enlaces con otros grupos (UCSF, 2020).

Previo a lo análisis bioinformáticos, las estructuras proteicas fueron generadas en la plataforma de Swissmodel, que es un servidor pionero en el modelado automatizado donde a partir de una secuencia de aminoácido se infiere la estequiometría y la estructura de la proteína mediante modelado por homología (Waterhouse, A *et al.*, 2018). Se utilizaron parámetros como el gráfico de Ramachandran que representa la distribución de las conformaciones de la cadena de aminoácidos y se obtuvieron valores de 95.82% para la secuencia de referencia y 95.49% para la secuencia 1037.4. Al ser estos valores arriba del 90% se considera un valor aceptado de calidad (UCSF, 2014). Igualmente, para verificar la calidad de los modelos previo a los ensayos se realizaron los análisis de ERRAT que sirve para evaluar el progreso de la construcción y el refinamiento de modelos, y se consideran valores aceptados arriba del 90% (Bowie *et al.*, 1991). Finalmente, el test de Verify3D que

evalúa la compatibilidad del modelo con su propia secuencia de aminoácidos, considera aprobado valores donde más del 80% de los aminoácidos tienen un score de  $>0.1$ . Por lo tanto, el modelo de referencia como la secuencia 1037.4 obtuvieron resultados aprobatorios para las pruebas de calidad de sus estructuras (UCLA, 2025). Asimismo, por medio del superposicionamiento de las estructuras se puede visualizar que la zona del aminoácido 202 no es diferente estructuralmente entre ambos modelos, por lo que se evaluó la interacción con el ligando del ácido N-acetilneuramínico por medio de acoplamiento molecular como lo describe Butt, S. y colaboradores en 2020, donde se menciona el uso de Autodock vina y Chimera X para realizar este análisis de proteína-ligando. En este proyecto el resultado para la estructura de referencia se obtuvo un Score de -6.939, para la estructura de la secuencia 1037.4 el score fue de -6.949, tomando en cuenta que AutoDock Vina genera posiciones del ligando y las clasifica según la afinidad de unión, los valores más bajos hacen referencia a interacciones que se ven más favorecidas (Gilsom & Zhou, 2007) y por lo tanto mayor afinidad de unión, recordando que la energía libre de Gibbs nos indica la espontaneidad de un proceso (Khavani *et al.*, 2023), por lo que la estructura correspondiente a la secuencia 1037.4 tiene una interacción levemente más favorecida que la secuencia de referencia MK630778.1, por lo que en la naturaleza es más probable que ocurra la unión con el ácido N-acetilneuramínico del tracto respiratorio de los humanos. Utilizando la herramienta de Ligplot se pudo observar las interacciones entre el ligando y la proteína donde ambos modelos coinciden en la interacción por puentes de hidrógeno con los residuos 136, 145, 148, 160, 161, 163 y 165, y que los residuos 146, 149, 166, 167 y 269 interaccionan de manera hidrofóbica con el ligando. De acuerdo con Wen y colaboradores en 2018, se ha reportado que la presencia de una Fenilalanina en la posición 161 está asociada a un aumento en la afinidad con los glicanos 3'-sialil- N -acetil -lactosamina, este aminoácido fue encontrado en la posición 161 para ambas secuencias, además se ha visto se encuentra formando parte de un núcleo hidrofóbico próximo a la base del sitio que se une al receptor compuesto por otros residuos W127, L154, I164 y F251 (Broszeit *et al.*, 2019).

La diferencia principal radica en que el ligando interactúa mediante puente de hidrógeno con el residuo 162 correspondiente al modelo de la secuencia de referencia MK630778.1 y en el modelo de la secuencia 1037.4 está involucrado en la interacción hidrofóbica, además de que hay diferencias en los tamaños de los puentes de hidrógenos entre ambos acoplamientos moleculares. Un puente de hidrógeno es una atracción electrostática entre moleculares

polares, y el tamaño del enlace se refiere a la distancia de interacción entre los átomos, que entre mayor sea la distancia entre ellos más débil puede ser esta interacción (Jeffrey G, 1997); por otra parte una interacción hidrofóbica se lleva a cabo entre aminoácidos no polares, en este caso la tirosina es un aminoácido polar que por el anillo bencénico en su composición puede comportarse como hidrófobo en soluciones acuosas, lo que causa que se agrupe con otras moléculas no polares para minimizar el contacto con el agua, el cual fomenta la unión con el ligando. Sin embargo, un enlace de hidrógeno tiende a ser una interacción más fuerte ya que se da entre los átomos, mientras que las interacciones hidrofóbicas son un efecto de entropía (Buckingham, A. *et al.*, 2008) (Pace, C *et al.*, 2011). Esto podría explicar por qué para la estructura de la secuencia 1037.4 se vio una interacción levemente más favorecida a comparación de la estructura de la secuencia de referencia.

De acuerdo con el árbol filogenético se mapearon 39 secuencias de diferentes partes del mundo, correspondientes al virus de influenza A del subtipo H1N1 reportadas en el periodo de 2018-2019, al realizar este análisis se pudo observar que las secuencias más cercanas a la 1037.4 correspondieron en su mayoría a secuencias recolectadas en el continente americano, específicamente de México y Estados Unidos. La secuencia con mayor similitud con la 1037.4 en este análisis fue la MK633741.1, seguido de la secuencia MK630778.1 utilizada como referencia en este proyecto. Se puede observar que la mayoría de las secuencias de Asia y Europa se encuentran lejanas evolutivamente de las secuencias de América, esto puede deberse a que hubo divergencia entre un linaje a partir de un ancestro en común y a partir de este los cambios entre los linajes cambiaron independientemente de los otros. Una de las razones por las que se puede observar esta división entre los grupos es debido a que la circulación de estas cepas se conserva mayormente en una misma zona geográfica y que con el transcurso de los años evoluciona entre las mismas cepas circulantes de la población de cada continente, por lo que se va segregando cada vez más.

## 9.CONCLUSIONES

- La secuencia 1037.4 obtenida en este proyecto presentó un cambio de aminoácido en la posición 202 de isoleucina por treonina, de acuerdo con la secuencia de referencia MK630778.1.
- Se pudieron observar cambios en las características fisicoquímicas de ambos modelos proteicos específicamente en donde se pudo observar una disminución en el análisis de hidrofobicidad en el modelo de la secuencia 1037.4 con respecto al modelo de la secuencia de referencia. En ambos modelos se encontraron cambios en los análisis de desorden y de potencial de óxido reducción, tanto aumentos como disminuciones entre los modelos dependiendo del residuo aminoacídico.
- No se encontraron cambios estructurales entre los modelos de las proteínas de las secuencias 1037.4 y de referencia MK630778.1 al realizar el superposicionamiento de las estructuras.
- el modelo de la secuencia 1037.4 tuvo una interacción levemente más favorecida con el ligando ácido N-acetilneuramínico en relación con la interacción del ligando con el modelo de la secuencia referencia MK630778.1
- Se pudo observar que la interacción ligando-proteína se realizó cerca del residuo 161, reportado como involucrado en la interacción con el ácido N-acetilneuramínico
- El residuo 162 presentó un comportamiento diferente entre ambos modelos, donde en el modelo de la secuencia 1037.4 actuó formando un puente de hidrógeno con el ligando.

## **10.PERSPECTIVAS**

Este proyecto podría complementarse con el análisis de la subunidad HA2 de la Hemaglutinina del virus de la influenza A y el incremento de muestras a analizar con el fin de poder ubicar otros cambios en las secuencias tanto aminoacídicas y nucleotídicas que puedan afectar la interacción con el receptor.

Igualmente consideramos que sería enriquecedor el realizar análisis similares con muestras de temporadas más recientes, para poder contrastar los cambios entre las secuencias posterior a la pandemia de COVID-19.

## 11.BIBLIOGRAFÍA

- Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios . (AEMPS. (2010). Guía Práctica Para La Utilización De Muestras Biológicas. [https://www.aemps.gob.es/medicamentos-de-uso-humano/guia\\_muestrasbio/](https://www.aemps.gob.es/medicamentos-de-uso-humano/guia_muestrasbio/)
- Arias-C, López S. (2009). Anatomía del virus de la influenza A/H1N1-2009. *Revista Ciencia- Academia Mexicana de Ciencias*, 60(3), 14-24. Recuperado en 03 de febrero de 2022 de [https://revistaciencia.amc.edu.mx/images/revista/60\\_3/PDF/02-INFLUENZA.pdf](https://revistaciencia.amc.edu.mx/images/revista/60_3/PDF/02-INFLUENZA.pdf)
- Badi, M.A., Al-Shuhaib, M.B.S., Aljubouri, T.R.S. *et al.* (2021) Rapid and optimized protocol for efficient PCR-SSCP genotyping for wide ranges of species. *Biologia* **76**, 2413–2420 . <https://doi.org/10.1007/s11756-021-00776-z>
- Baumeister, Elsa., Palacios, Gustavo., Cisterna, Daniel., Solovyov, Alexander., Hui, Jeffrey., Savji, Nazir., Bussetti, A.Valeria., Campos, Ana., Pontoriero, Andrea., Jabado, Omar J., Street, Craig, Hirschberg, David L., Rabadan, Raul, Alonio, Virginia, Molina, Viviana, Hutchison, Stephen, Egholm, Michael, & Lipkin, W. Ian. (2010). Molecular characterization of severe and mild cases of influenza A (H1N1) 2009 strain from Argentina. *Medicina (Buenos Aires)*, 70(6), 518-523. Recuperado en 05 de agosto de 2022, de [http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S002576802010000600006&lng=es&tlng=en](http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S002576802010000600006&lng=es&tlng=en).
- Beidler, J. L., Hilliard, P. R., & Rill, R. L. (1982). Ultrasensitive staining of nucleic acids with silver. *Analytical biochemistry*, 126(2), 374–380. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(82\)90530-9](https://doi.org/10.1016/0003-2697(82)90530-9)
- Bermúdez-de-León, M., Peñuelas-Urquides, K., Aguado-Barrera, M. E., Currás-Tuala, M. J., Escobedo-Guajardo, B. L., González-Ríos, R. N., Mata-Tijerina, V. L., & Vázquez-Monsiváis, O. E. (2013). In vitro transcribed RNA molecules for the diagnosis of pandemic 2009 influenza A(H1N1) virus by real-time RT-PCR. *Journal of virological methods*, 193(2), 487–491. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2013.07.016>
- Bowie, J. U., Lüthy, R., & Eisenberg, D. (1991). A method to identify protein sequences that fold into a known three-dimensional structure. *Science (New York, N.Y.)*, 253(5016), 164–170. <https://doi.org/10.1126/science.1853201>

- Buckingham, A. D., Del Bene, J. E., & McDowell, S. A. C. (2008). The hydrogen bond. *Chemical Physics Letters*, 463(1-3), 1-10.
- Butt, S. S., Badshah, Y., Shabbir, M., & Rafiq, M. (2020). Molecular Docking Using Chimera and Autodock Vina Software for Nonbioinformaticians. *JMIR bioinformatics and biotechnology*, 1(1), e14232. <https://doi.org/10.2196/14232>
- Canche-Pech, J.R., Conde-Ferraz, L., Puerto-Solis, M., Gonzalez-Losa, R., Granja-Pérez, P., Villanueva-Jorge, S., *et al.*, (2017) Temporal distribution and genetic variants in influenza A (H1N1) pdm09 virus circulating in Mexico, seasons 2012 and 2013. *PLoS ONE* 12(12): e0189363. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0189363>
- Carrada, B.T. (2011). Influenza humana: Avances recientes en la patogenia e histopatología. Descripción del brote pandémico en México 2009-2010. *Rev Mex Patol Clin Med Lab*. 2011;58(2):60-101.
- Carter, T., & Iqbal, M. (2024). The Influenza A Virus Replication Cycle: A Comprehensive Review. *Viruses*, 16(2), 316. <https://doi.org/10.3390/v16020316>
- Centers for Disease Control and Prevention. (2008). Update: Influenza Activity --- United States, September 28--November 29, 2008. *CDC, Morbidity and Mortality Weekly Report (MMWR)*. <https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5749a3.htm>
- Chiesa, I. (2015). RAMR - Volumen 15, Número 4 - Circulación de virus de influenza A y cepas resistentes a oseltamivir en el período invernal del año 2013. *Revista Americana de Medicina Respiratoria*. [http://www.ramr.org/articulos/volumen\\_15\\_numero\\_4/articulos\\_originales/articulos\\_originales\\_circulacion\\_de\\_virus\\_de\\_influenza\\_a\\_y\\_cepas\\_resistentes\\_a\\_oseltamivir.php](http://www.ramr.org/articulos/volumen_15_numero_4/articulos_originales/articulos_originales_circulacion_de_virus_de_influenza_a_y_cepas_resistentes_a_oseltamivir.php)
- Comas, V. (2015). análisis evolutivo de cepas pandémicas y post pandémicas del virus Influenza A H1N1: una mirada profunda a la dinámica poblacional de los virus RNA. Tesis de maestría. Universidad de la República (Uruguay). Facultad de Ciencias
- Crossley BM, Bai J, Glaser A, et al. (2020). Pautas para la secuenciación de Sanger y el seguimiento de ensayos moleculares. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. ;32(6):767-775. doi: 10.1177/1040638720905833

- de Bruin, A. C. M., Funk, M., Spronken, M. I., Gultyaev, A. P., Fouchier, R. A. M., & Richard, M. (2022). Hemagglutinin Subtype Specificity and Mechanisms of Highly Pathogenic Avian Influenza Virus Genesis. *Viruses*, *14*(7), 1566. <https://doi.org/10.3390/v14071566>
- Degoot AM, Adabor ES, Chirove F, Ndifon W. Predicting Antigenicity of Influenza A Viruses Using biophysical ideas. *Sci Rep*. 2019 Jul 15;9(1):10218. doi: 10.1038/s41598-019-46740-5. PMID: 31308446; PMCID: PMC6629677.
- Dhanasekaran, V., Sullivan, S., Edwards, KM . (2022). Gripe estacional humana en tiempos de COVID-19 y las posibles consecuencias de la eliminación del linaje de la gripe. *Nat Commun* **13** , 1721 , <https://doi.org/10.1038/s41467-022-29402-5>
- Dong, Y., Zhu, H. (2015). Single-strand conformational polymorphism analysis: basic principles and routine practice. *Methods Mol Med* ;108:149-57. doi: 10.1385/1-59259-850-1:149. PMID: 16028682.
- Dosztányi, Z. (2018), Predicción del trastorno proteico según la IUPred. *Protein Science*, *27*: 331-340. <https://doi.org/10.1002/pro.3334>
- Du, R., Cheng, H., Cui, Q., Peet, N. P., Gaisina, I. N., & Rong, L. (2021). Identification of a novel inhibitor targeting influenza A virus group 2 hemagglutinins. *Antiviral research*, *186*, 105013. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2021.105013>
- Eisen, A. K. A., Gularte, J. S., Demoliner, M., Abreu Goés Pereira, V. M., Heldt, F. H., Filippi, M., Spilki, F. R. (2021). *Low circulation of Influenza A and coinfection with SARS-CoV-2 among other respiratory viruses during the COVID-19 pandemic in a region of southern Brazil.* *Journal of Medical Virology*, *93*(7), 4392–4398. doi:10.1002/jmv.26975
- Estrada-Cuzcano, A., Sandoval, José., Guevara-Fujita, M. L., & Fujita, Ricardo. (2005). Uso de la técnica SSCP para detectar mutaciones puntuales del ADN mitocondrial humano. *Revista Peruana de Biología*, *12*(3), 349-358. Recuperado en 05 de agosto de 2022, de [http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S172799332005000300003&lng=es&tlng=es](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S172799332005000300003&lng=es&tlng=es).

- Gamblin, S. J., Vachieri, S. G., Xiong, X., Zhang, J., Martin, S. R., & Skehel, J. J. (2021). Hemagglutinin Structure and Activities. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 11(10), a038638. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a038638>
- Gilson MK, Zhou HX. Cálculo de las afinidades de unión proteína-ligando. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*. 2007;36:21–42. doi: 10.1146/annurev.biophys.36.040306.132550.
- Goñi, N. (2011). Variabilidad genética y evolución molecular de virus de la influenza A en Uruguay. Tesis de Doctorado. Universidad de la República (Uruguay).
- Grasso, E. J., Sottile, A. E., & Coronel, C. E. (2016). Structural Prediction and *In Silico* Physicochemical Characterization for Mouse Caltrin I and Bovine Caltrin Proteins. *Bioinformatics and biology insights*, 10, 225–236. <https://doi.org/10.4137/BBI.S38191>
- Griffin, E. F., & Tompkins, S. M. (2023). Fitness Determinants of Influenza A Viruses. *Viruses*, 15(9), 1959. <https://doi.org/10.3390/v15091959>
- Hashim, H. O., & Al-Shuhaib, M. B. S. (2019). Exploring the potential and limitations of PCR-RFLP and PCR-SSCP for SNP detection: A review. *Journal of applied biotechnology reports*, 6(4), 137-144.
- Hernández-Ávila M, Alpuche-Aranda CM. (2020). Mexico: Lessons learned from the 2009 pandemic that help us fight COVID-19. *Healthc Manage Forum*. 2020 Jul;33(4):158-163. doi: 10.1177/0840470420921542. Epub . PMID: 32372664; PMCID: PMC7218351.
- Hernández-González, D. Lucía., (2010). Diseño y estandarización de un sistema PCR-SSCP del gen E6 para detección y tipificación del virus del papiloma humano (VPH). Universidad de los Andes Venezuela <http://www.saber.ula.ve/handle/123456789/38763>
- Huang P, Sun L, Li J, Wu Q, Rezaei N, Jiang S, Pan C. Potential cross-species transmission of highly pathogenic avian influenza H5 subtype (HPAI H5) viruses to humans calls for the development of H5-specific and universal influenza vaccines. *Cell Discov*. 2023 Jun 16;9(1):58. doi: 10.1038/s41421-023-00571-x. PMID: 37328456; PMCID: PMC10275984.
- Hun-Opfer, L. (2009). El virus influenza. *Acta Pediátrica Costarricense*, 21(1), 05-07. Retrieved January 15, 2022, from [http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1409-00902009000100001&lng=en&tlng=es](http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1409-00902009000100001&lng=en&tlng=es).

- Hurt AC, Hardie K, Wilson NJ, Deng YM, Osbourn M, Leang SK, Lee RT, Iannello P, Gehrig N, Shaw R, Wark P, Caldwell N, Givney RC, Xue L, Maurer-Stroh S, Dwyer DE, Wang B, Smith DW, Levy A, Booy R, Dixit R, Merritt T, Kelso A, Dalton C, Durrheim D, Barr IG. Characteristics of a widespread community cluster of H275Y oseltamivir-resistant A(H1N1)pdm09 influenza in Australia. *J Infect Dis.* (2012);206(2):148-57. doi: 10.1093/infdis/jis337. Epub 2012 May 4. PMID: 22561367; PMCID: PMC3379839.
- Jeffrey, G. A (1997). *An introduction to hydrogen bonding* (Vol. 12, p. 228). New York: Oxford university press.
- Kakavas, V. K., Plageras, P., Vlachos, T. A., Papaioannou, A., & Noulas, V. A. (2008). PCR-SSCP: a method for the molecular analysis of genetic diseases. *Molecular biotechnology*, 38(2), 155–163. <https://doi.org/10.1007/s12033-007-9006-7>.
- Khavani, M., Mehranfar, A., & Mofrad, M. R. K. (2023). On the potentials of sialic acid derivatives as inhibitors for the mumps virus: A molecular dynamics and quantum chemistry investigation. *Virus research*, 326, 199050. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2023.199050>
- Kirkpatrick, E., Qiu, X., Wilson, P. C., Bahl, J., & Krammer, F. (2018). The influenza virus hemagglutinin head evolves faster than the stalk domain. *Scientific reports*, 8(1), 10432. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-28706-1>
- Koen, J. S. (1919). A Practical Method for Field Diagnosis of Swine Diseases , *American Journal of Veterinary Medical*, 14: 468–70.
- Kosik, I., & Yewdell, J. W. (2019). Influenza Hemagglutinin and Neuraminidase: Yin-Yang Proteins Coevolving to Thwart Immunity. *Viruses*, 11(4), 346. <https://doi.org/10.3390/v11040346>
- Kourí, Pedro. (2001). Enfermedades virales emergentes. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 53(1), 5-15. Recuperado en 22 de enero de 2022, de [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0375-07602001000100001&lng=es&tlng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0375-07602001000100001&lng=es&tlng=es).
- Krammer, F., Smith, GJD., Fouchier, RAM., Peiris M., Kedzierska, K., Doherty, PC., Palese , P., Shaw, ML., Treanor, J., Webster, RG., García-Sastre A. (2018). Influenza. *Nat Rev Dis Primers* ;4(1):3. doi: 10.1038/s41572-018-0002-y. PMID: 29955068; PMCID: PMC7097467.

- Lakadamyali, M., Rust, M. J., & Zhuang, X. (2004). Endocytosis of influenza viruses. *Microbes and infection*, 6(10), 929–936. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2004.05.002>
- Leung, NHL, Chu, DKW, Shiu, EYC (2020). Eliminación de virus respiratorios en el aliento exhalado y eficacia de las mascarillas faciales. *Nat Med* **26**, 676–680 <https://doi.org/10.1038/s41591-020-0843-2>
- Luczo, J. M., Ronzulli, S. L., & Tompkins, S. M. (2021). Influenza A Virus Hemagglutinin and Other Pathogen Glycoprotein Interactions with NK Cell Natural Cytotoxicity Receptors NKp46, NKp44, and NKp30. *Viruses*, 13(2), 156. <https://doi.org/10.3390/v13020156>
- M. Carr, J. I. Robinson, R. Dimitriou, A. F. Markham, A. W. Morgan, D. T. Bonthron, Inferring relative proportions of DNA variants from sequencing electropherograms, *Bioinformatics*, Volume 25, Issue 24, December 2009, Pages 3244–3250, <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp583>
- Manjarrez , ZME., Arenas, LG. (1999). Virus influenza: Enigma del pasado y del presente. *Rev Inst Nal Enf Resp Mex.* 12(4):290-299
- Mantilla-Anaya, J. Ramón., Barreto-Hernández, Emiliano., Reguero-Reza, M. Teresa., & Velandia-Rodríguez, Daniel. Augusto. (2009). Identificación por PCR-SSCP de genes de cefotaximasas en aislamientos hospitalarios de Enterobacteriaceae. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 11(2), 57-65. Retrieved August 05, 2022, from [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0123-34752009000200007&lng=en&tlng=es](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0123-34752009000200007&lng=en&tlng=es).
- Olea Jiménez, V., Mora-Ordóñez, J.M., Rodríguez-Díez, A., & Calbo-Torrecillas, F.. (2012). Gripe A: ¿seguirá mutando?. *Medicina Intensiva*, 36(1), 64. Recuperado en 15 de febrero de 2022, de [http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0210-56912012000100014&lng=es&tlng=es](http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0210-56912012000100014&lng=es&tlng=es).
- Oropesa-Fernández, Suset., Morier-Díaz, Luis., Vázquez-Ramudo, Susana., Goyenechea -Hernández, Angel., Valdivia-Romero, Angel., Hernández-Espinosa, Bárbara, & García Infante, Serafina. (1996). Caracterización de los virus de influenza por el método de la inmunoperoxidasa utilizando anticuerpos monoclonales: Montaje y validación. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 48(3), 149-154. Recuperado en 05 de agosto de 2022, de

[http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S037507601996000300002&lng=es&tlng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S037507601996000300002&lng=es&tlng=es).

- Pace, C. N., Fu, H., Fryar, K. L., Landua, J., Trevino, S. R., Shirley, B. A., ... & Grimsley, G. R. (2011). Contribution of hydrophobic interactions to protein stability. *Journal of molecular biology*, 408(3), 514-528.
- Pool, Huaranga., Rojas, Nancy., Gutiérrez, Victoria., Ruiton, Sila., Gallardo, Emelda., Achata, Jorge., & Galarza, Marco. (2017). Detección de virus influenza A, B y subtipos A (H1N1) pdm09, A (H3N2) por múltiple RT-PCR en muestras clínicas. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*, 34(2), 192-200. <https://dx.doi.org/10.17843/rpmesp.2017.342.2054>
- Prachanronarong KL, AS, P, M, S, Y, T, Q, N, KB, TF, N, JD, DNA, WA, RW, CA, J P. (2019). Mutations in Influenza A Virus Neuraminidase and Hemagglutinin Confer Resistance against a Broadly Neutralizing Hemagglutinin Stem Antibody. *J Virol* 93:10.1128/jvi.01639-18. <https://doi.org/10.1128/jvi.01639-18>
- Ranaweera, A., Ratnayake, P. U., & Weliky, D. P. (2018). The Stabilities of the Soluble Ectodomain and Fusion Peptide Hairpins of the Influenza Virus Hemagglutinin Subunit II Protein Are Positively Correlated with Membrane Fusion. *Biochemistry*, 57(37), 5480–5493. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.8b00764>
- Sanderson, B. A., Araki, N., Lilley, J. L., Guerrero, G., & Lewis, L. K. (2014). Modification of gel architecture and TBE/TAE buffer composition to minimize heating during agarose gel electrophoresis. *Analytical biochemistry*, 454, 44–52. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2014.03.003>
- Secretaria de Salud & Centro Nacional de Excelencia Tecnológica en Salud. (2020). Prevención, diagnóstico y tratamiento de la Influenza estacional. Guía de práctica clínica, evidencias y recomendaciones. <http://www.cenetec-difusion.com/CMGPC/GPC-SS-384-20/>
- Shastry B. S. (2009). SNPs: impact on gene function and phenotype. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 578, 3–22. [https://doi.org/10.1007/978-1-60327-411-1\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-60327-411-1_1)
- Sriwilaijaroen, N., & Suzuki, Y. (2012). Molecular basis of the structure and function of H1 hemagglutinin of influenza virus. *Proceedings of the Japan Academy. Series B, Physical and biological sciences*, 88(6), 226–249. <https://doi.org/10.2183/pjab.88.226>

- Stipoljev, Sunčica, Elena Bužan, Barbora Rolečková, Laura Iacolina, and Nikica Šprem. (2020). "MHC Genotyping by SSCP and Amplicon-Based NGS Approach in Chamois" *Animals* 10, no. 9: 1694. <https://doi.org/10.3390/ani10091694>
- Taishan Hu, Nilesh Chitnis, Dimitri Monos, Anh Dinh. (2021). Next-generation sequencing technologies: An overview, *Human Immunology*, Volume 82, Issue 11, Pages 801-811, ISSN 0198-8859, <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2021.02.012>. (<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0198885921000628>)
- Talavera. (2010). Tras un año de los comienzos de la pandemia de influenza AH1N1. *Revista de Biomedicina UADY*. <https://www.medigraphic.com/pdfs/revbio/bio-2010/bio101f.pdf>
- Talledo, M., Zumaeta, K. (2009). Los virus Influenza y la nueva pandemia A/H1N1. *Revista Peruana de Biología*, 16(2), 227-238. Recuperado en 03 de febrero de 2022, de [http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1727-99332009000200018&lng=es&tlng=es](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1727-99332009000200018&lng=es&tlng=es).
- Taubenberger JK, Morens DM. (2020). The 1918 Influenza Pandemic and Its Legacy. *Cold Spring Harb Perspect Med*. Oct 1;10(10):a038695. doi: 10.1101/cshperspect.a038695. PMID: 31871232; PMCID: PMC7528857.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G., Gibson, T. J.: CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, vol. 22, no. 22, pp. 4673-4680 (1994) doi: 10.1093/nar/22.22.4673
- Toro Montoya, A. I., & Aguirre Muñoz, C. (2009). Influenza A. *Medicina Y Laboratorio*, 15(3-4), 111-144. Recuperado a partir de <https://medicinaylaboratorio.com/index.php/myl/article/view/417>
- Trott, O., & Olson, A. J. (2010). AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *Journal of computational chemistry*, 31(2), 455–461. <https://doi.org/10.1002/jcc.21334>
- Tzarum, N., de Vries, R. P., Zhu, X., Yu, W., McBride, R., Paulson, J. C., & Wilson, I. A. (2015). Structure and receptor binding of the hemagglutinin from a human H6N1 influenza virus. *Cell host & microbe*, 17(3), 369–376. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2015.02.005>

- UCSF EDU (2020). Imagen Tutorial: Surface Propertis. Chimera Turorial Index <https://www.rbvi.ucsf.edu/chimera/docs/UsersGuide/tutorials/surfprop.html>
- UCSF, Laboratorio de gráficos computacionales (2014). Ramachandran Plot. <https://www.cgl.ucsf.edu/chimera/docs/ContributedSoftware/ramachandran/ramachandran.html>
- Van-Reeth, K. (2007). Avian and swine Influenza viruses: our current understanding of the zoonotic risk. *Veterinary Research* 38:243-260.
- Wang Y, Tang CY, Wan XF. (2021). Antigenic characterization of influenza and SARS-CoV-2 viruses. *Anal Bioanal Chem.* 2022 Apr;414(9):2841-2881. doi: 10.1007/s00216-021-03806-6. Epub Dec 14. PMID: 34905077; PMCID: PMC8669429.
- Waterhouse, A., Bertoni, M., Bienert, S., Studer, G., Tauriello, G., Gumienny, R., Heer, F. T., de Beer, T. A. P., Rempfer, C., Bordoli, L., Lepore, R., & Schwede, T. (2018). SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic acids research*, 46(W1), W296–W303. <https://doi.org/10.1093/nar/gky427>
- Wille M, Holmes EC. /. (2020). The Ecology and Evolution of Influenza Viruses. *Cold Spring Harb Perspect Med* Jul 1;10(7):a038489. doi: 10.1101/cshperspect.a038489. PMID: 31871237; PMCID: PMC7328453.
- Wu, N. C., & Wilson, I. A. (2020). Influenza Hemagglutinin Structures and Antibody Recognition. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 10(8), a038778. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a038778>
- Xiong J, Zhao P, Yang P, Yan Q, Jiang L. Evolutionary dynamics of the H7N9 avian influenza virus based on large-scale sequence analysis. *PLoS One.* 2019 Aug 12;14(8):e0220249. doi: 10.1371/journal.pone.0220249. PMID: 31404069; PMCID: PMC6690514.
- Zhao, C., & Pu, J. (2022). Influence of Host Sialic Acid Receptors Structure on the Host Specificity of Influenza Viruses. *Viruses*, 14(10), 2141. <https://doi.org/10.3390/v14102141>

## 12.RESUMEN BIOGRÁFICO

### Carolina Palestino Frias

Candidato para el grado de Maestro en Ciencias con Orientación en Inmunobiología

**Título de tesis:** “ANÁLISIS IN SILICO DE LA SUBUNIDAD HA1 DE LA HEMAGLUTININA DEL VIRUS DE LA INFLUENZA A(H1N1)PDM09 DE CEPAS CIRCULANTES EN UNA POBLACIÓN MEXICANA”

**Campo de estudio:** Virología e Inmunobiología

**Datos personales:** Nacida en Villahermosa, Tabasco el 17 de Junio de 1999.

**Educación:** Egresada de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grado obtenido de Lic. Biotecnología Genómica, 2022. Tesis titulada: “Construcción de un vector plasmídico recombinante como control positivo para la detección de la mutación H275Y del gen de la neuraminidasa en cepas de influenza A (H1N1)pdm09”.

#### **Reconocimientos:**

- Acreditación del Examen General de Egreso de Licenciatura (EGEL), 2022.

#### **Experiencia profesional:**

- Evaluador en II Evento de Estudiantes de Psicología y Neurociencias. Monterrey, México. Octubre 2022

#### **Presentaciones en modalidad póster**

- Presentación en el XXVIII Foro delegacional de Monterrey del IMSS, 2024
- Presentación en la Expo Científica CTR, 2024
- Foro Nacional de la Salud del IMSS, 2024.

**Cursos/Capacitaciones:**

- Curso de Modelado Molecular, Octubre de 2023
- Curso de Docking Molecular, Noviembre de 2023
- Participación en el PandemicTech Journal Club, Diciembre 2023

**Publicaciones:**

- Artículo aceptado y publicado en la revista Ciencia UANL, con el escrito “El virus de la influenza y su resurgimiento después de la pandemia de COVID-19”, Edición Marzo-Abril, 2025.

