

Análisis evolutivo del virus de la influenza A (H1N1):

Un reporte preliminar

Grupo de Análisis evolutivo de la influenza A (H1N1)

Arturo Becerra, Amanda Castillo, César Hernández Ciencias Biológicas, María Eugenia Jiménez, Antonio Lazcano Araujo, Yolanda López Vidal, Alejandro F. Macías, Susana Magallón, Layla Michán, Adolfo Navarro, Daniel Piñero, Samuel Ponce de León, Lorenzo Segovia, Ana María Velasco y Pablo Vinuesa

Presentación

Toda epidemia es un complejo fenómeno médico con profundas implicaciones sociales, económicas y biológicas. Quienes están mejor preparados para contender con ellas son los profesionales de la salud. Sin embargo, en los últimos años, gracias al desarrollo de la biología molecular, la genómica, la bioinformática y otras disciplinas, se han generado una serie de instrumentos teóricos que permiten analizar bajo ópticas novedosas las características de agentes patógenos. Ante la emergencia que significó la epidemia provocada por el virus A (H1N1), y con el ánimo de contribuir a los esfuerzos de la comunidad médica, un grupo de investigadores de diversas entidades académicas y gubernamentales nos reunimos para tratar de responder a algunas de las preguntas sobre el origen, las características y la transmisión del virus de la influenza A (H1N1) desde el punto de vista evolutivo, entre las que están:

- La variabilidad del genoma del virus A (H1N1): mutaciones y recombinación.
- La variabilidad biológica de las poblaciones de A (H1N1).
- La historia evolutiva de A (H1N1).
- La región y fecha en que pudo haber surgido el virus A (H1N1).
- Evaluación bioinformática de los reportes sobre inmunidad cruzada.
- La diferencia entre el número de fallecimientos en México comparado con los de otros países.

Hemos procurado sistematizar la información impresa y electrónica certificada sobre el tema y difundirla utilizando la ciberinfraestructura (aplicaciones, recursos y servicios electrónicos) que permiten el acceso automatizado e inmediato, indispensable en cualquier momento crítico. Los productos de nuestro trabajo serán, en esencia, documentos públicos dirigidos a la comunidad médico/científica, periodistas y comunicadores y estudiantes y maestros, e incluyen una página electrónica y un blog con acceso libre que incluye una liga de acceso restringido en donde se encuentran los documentos en proceso del grupo.

La dirección de nuestro blog de acceso libre. :
<http://literaturainfluenza.blogspot.com/>

Arturo Becerra, Facultad de Ciencias, UNAM

Amanda Castillo, CINVESTAV-Irapuato, IPN

César Hernández, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, IPN

María Eugenia Jiménez, Birmex, S.A.

Antonio Lazcano Araujo, Facultad de Ciencias, UNAM

Yolanda López Vidal, Facultad de Medicina, UNAM

Alejandro F. Macías, INNN “Salvador Zubirán”, SSA

Susana Magallón, Instituto de Biología, UNAM

Layla Michán, Facultad de Ciencias, UNAM

Adolfo Navarro, Facultad de Ciencias, UNAM

Daniel Piñero, Instituto de Ecología, UNAM

Samuel Ponce de León, Birmex, S. A.

Lorenzo Segovia, Instituto de Biotecnología, UNAM

Ana María Velasco, Birmex, S. A.

Pablo Vinuesa, Centro de Ciencias Genómicas, UNAM

Introducción

El virus de la influenza humana A (H1N1) es un virus que pertenece a la familia Orthomixoviridae. Otros miembros conocidos de esta familia incluye al virus de la influenza estacional, contra el cual se aplican anualmente vacunas. El nombre común es el de ortomixovirus, y el término *mixo* se refiere a la interacción de que estos virus tienen con las membranas mucosas del aparato respiratorio.

Se conoce muy bien la estructura de los ortomixovirus. El genoma del A (H1N1) está formado por moléculas de RNA de una sola hebra divididas en ocho segmentos. Estos segmentos codifican para los distintos componentes del virus, con la excepción de la envoltura lipídica, que el virus toma de las membranas de células del tracto respiratorio que infectó y en donde se multiplica.

Material y métodos

Los resultados que se presentan en este documento resumen el análisis de secuencias de genes y genomas del virus A (H1N1) y de otros sistemas virales, que se encuentran disponibles en bases de datos públicas (GenBank y GISAID). Los análisis filogenéticos y de estructura de genes, tasas de mutación, haplotipos y los modelos de estructura terciaria se calcularon usando programas de acceso abierto disponibles en la red o elaborados por nuestro grupo.

La variabilidad del genoma del virus A (H1N1): mutaciones y recombinación

El genoma del virus está formado por ocho segmentos de RNA de una sola hebra. El RNA es un ácido nucleico más antiguo que el de DNA de doble hélice, y se replica gracias a una enzima llamada RNA polimerasa, formada por tres subunidades, PA, PB1 y PB2. Cada una de éstas subunidades se encuentran codificadas en segmentos distintos del genoma viral. Otros dos segmentos codifican para la hemaglutinina (HA) y la amneuroaminidasa (NA), las proteínas que se encuentran en la superficie del virus. Nuestros resultados indican que, a diferencia de otros sistemas biológicos, ningún gen del virus es producto de una duplicación interna.

Los genomas de RNA de una sola hebra tienen una tasa de mutaciones (es decir, de cambios genéticos) aproximadamente un millón de veces mayor que la del DNA de doble hélice, que es el material genético de nuestras células y todos los demás seres vivos. Las fuentes de variabilidad biológica de genomas segmentados de RNA de una sola hebra, como los del virus A (H1N1) son:

- a) Las bases del RNA, cuya secuencia constituye el mensaje genético del virus, pueden sufrir una serie de reacciones químicas al entrar en contacto con el medio acuoso del interior de una célula cuando ésta es infectada;
- b) La RNA polimerasa lee y replica los RNA que forman el genoma del virus, pero introduce un número considerable de errores que no son corregidos porque carece de la actividad correctora que se observa en las enzimas involucradas en la replicación del DNA;
- c) La recombinación que se produce cuando dos o más virus diferentes infectan una misma célula y se da un intercambio al azar de los segmentos del RNA; y
- d) Nuestros análisis muestran que los segmentos del RNA viral no presentan las llamadas secuencias simples, que son zonas del genoma con repetición de bases, y que en otros virus como el VIH son una fuente de variabilidad genética.

La enorme variabilidad genética del virus A (H1N1) implica que sus poblaciones se deben considerar como una “cuasiespecie”, es decir, como una unidad evolutiva que no es simplemente la suma de las propiedades de sus componentes individuales. Es decir, que aunque se reconozca una secuencia genómica consenso, la variabilidad de los demás genomas puede producir fluctuaciones a veces impredecibles.

Variabilidad biológica del virus A (H1N1)

La disponibilidad de una cantidad cada vez mayor de secuencias de genes y genomas de virus de la influenza, incluyendo las de un número mayor de cepas del virus A (H1N1) de diversa procedencia geográfica, ha permitido asomarnos a la extraordinaria diversidad de estas entidades biológicas. Como se puede observar en las Figuras 1 y 2 en donde se muestran las posiciones de las mutaciones detectadas en los distintos segmentos de RNA del virus A (H1N1), los cambios genéticos reportados a la fecha son una muestra de la extraordinaria variabilidad de éstos patógenos.



Figura 1. La comparación de 73 secuencias de aminoácidos de la proteínas secuencias mexicanas NP de distintas cepas del virus permite obtener una secuencia consenso en donde se observan sitios conservados (representados con por X) y sitios variables.

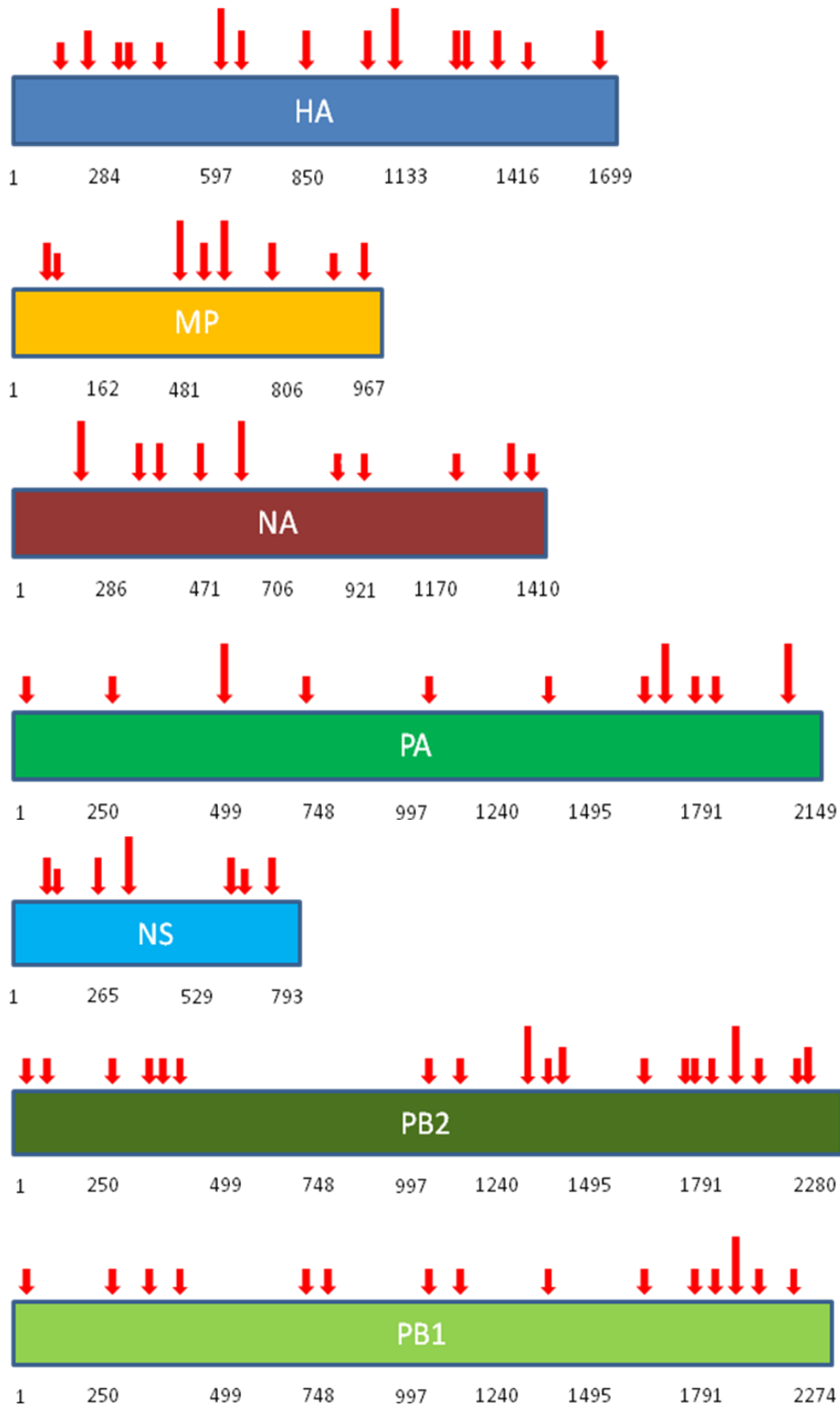


Figura 2. Los números corresponden a los sitios en ocho genes del A(H1N1) relacionadas con las cepas mexicanas en donde se han localizado mutaciones puntuales. La mayor parte de estos cambios corresponden a lo que se conoce como sustituciones sinónimas.

La comparación de las secuencias de los genes de las cepas mexicanas de A(H1N1) permite detectar los sitios marcados con flechas rojas en donde hay sustituciones puntuales en la información genética (Figura 2). Aunque la alta variabilidad del virus reduce la posibilidad de que sean idénticos entre sí, hemos podido reducir las distintas variantes del gen HA de las cepas mexicanas disponibles al día de hoy a cinco secuencias únicas.

Otra forma de analizar la variabilidad del virus es analizando la estructura tridimensional de las proteínas para las que codifican sus genes. En las Figuras 3 y 4 se muestran los modelos que hemos calculado para la neuraminidasa (NA), en donde se observan los sitios en donde interacciona con el antiviral osetalmivir. En la Figura 4 las regiones de la proteína que están muy conservadas están marcadas en color verde, las zonas variables en color amarillo, y las de color morado corresponden a los sitios que al mutar confieren resistencia contra el medicamento.

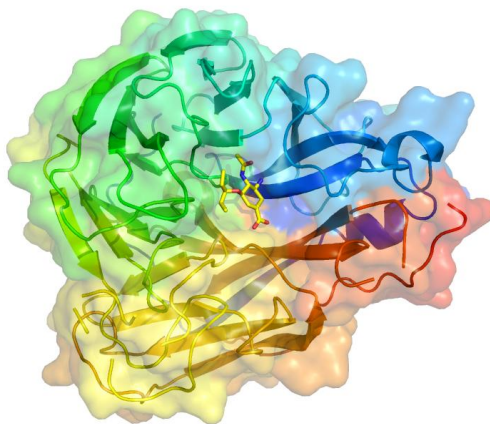


Figura 3. Estructura de la proteína N1 (3CL0) en donde se muestra la posición donde la proteína interacciona con el inhibidor Osetalmivir, que es la estructura molecular que se observa hacia el centro de la imagen en colores amarillo y rojo.

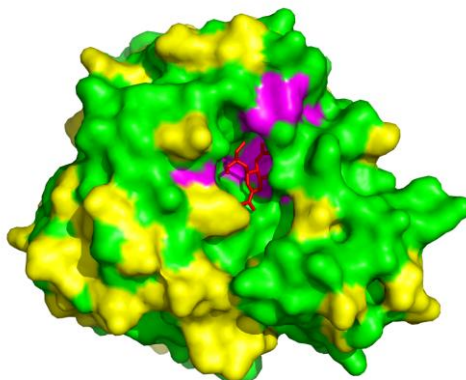


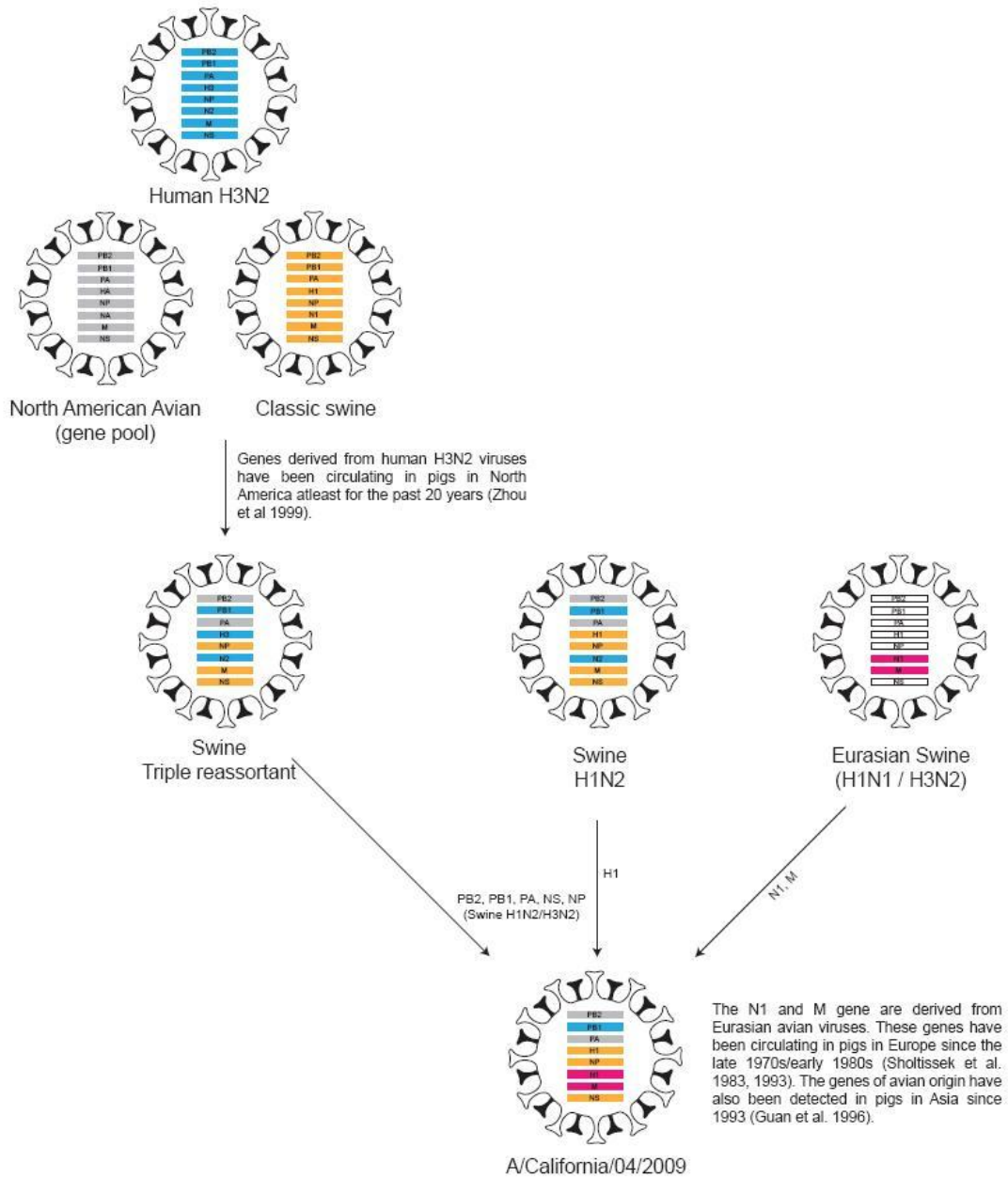
Figura 4. Estructura terciaria de la proteína NA, hacia cuyo centro se observa la molécula de osetalmivir. Las zonas variables, marcadas de color amarillo, tienden a estar localizadas hacia la superficie externa de la proteína. Las regiones asociadas con la resistencia están cercanas al sitio de interacción con el antiviral y son de color morado.

La historia evolutiva del virus A (H1N1)

La comparación de las secuencias de los genes o de sus productos, es decir, las proteínas, nos permite reconstruir la historia del virus. Esta se suele representar gráficamente como un árbol filogenético, que resume las relaciones evolutivas entre las distintas cepas. A pesar del escaso tiempo transcurrido, diversos autores como Holmes, Rambaut y otros han producido filogenias. La información disponible permite afirmar en forma categórica que ningún segmento del genoma viral es de origen mexicano.

Las Figuras 5 y 6 muestran en forma esquemática resumen los resultados que obtuvimos al analizar dos conjuntos de secuencias formados por seis genes de HA y cinco de NA de cepas mexicanas. Estas fueron comparadas con las 100 secuencias más parecidas a ellas disponibles en bases de datos públicas (NCBI y GISAID). Este es un procedimiento común en los análisis evolutivos. Como se observa en las Figuras 5 y 6, las cepas mexicanas pertenecen a un grupo que también incluye secuencias de los EEUU (California, Texas, Nueva York y Ohio), Dinamarca, Alemania, Holanda y Nueva Zelanda.

Las secuencias de éste conjunto son tan parecidas entre sí, que no es posible establecer en detalle sus relaciones evolutivas. En el caso de las secuencias de HA, los parientes más cercanos de este conjunto resultan ser las secuencias provenientes de virus porcinos de origen asiático (Figura 5). Sin embargo, el análisis de las secuencias de NA sugiere que los parientes más cercanos del conjunto que incluye a las cepas mexicanas son los grupos de virus de cerdos europeos (Figura 6). Estos resultados apoyan la hipótesis de Rambaut y otros autores en el sentido de que el virus A (H1N1) es resultado de varios eventos de recombinación (Figura 7).



Emergence pathway

PB2	- North American Avian	-> North American Swine (H1N2/H3N2)	-> A/California/04/2009
PB1	- Human H3N2	-> North American Swine (H1N2/H3N2)	-> A/California/04/2009
PA	- North American Avian	-> North American Swine (H1N2/H3N2)	-> A/California/04/2009
H1	- Classic swine	-> North American Swine (H1N2)	-> A/California/04/2009
NP	- Classic swine	-> North American Swine (H1N2/H3N2)	-> A/California/04/2009
N1	- Eurasian Avian	-> Eurasian swine	-> A/California/04/2009
M	- Eurasian Avian	-> Eurasian swine	-> A/California/04/2009
NS	- Classic swine	-> North American Swine (H1N2/H3N2)	-> A/California/04/2009

Figura 7. Tomada del sitio electrónico Phylogenetic analysis and reassortment history (A. Rambaut., Mayo 8, 2009.

http://tree.bio.ed.ac.uk/groups/influenza/wiki/aea97/Phylogenetic_analysis_and_reassortment.html

A pesar de que aún se carece de una muestra de secuencias que refleje de manera adecuada la verdadera distribución geográfica y temporal de las distintas cepas de A (H1N1), se puede subrayar que el análisis evolutivo del conjunto de secuencias disponibles no permite concluir de manera definitiva que el virus sea de origen mexicano.

Como se muestra en las Figuras 5 y 6, el grupo que incluye al conjunto de las cepas del virus de la epidemia de A (H1N1) está separado del resto de los demás virus de influenza por una distancia evolutiva considerable. Esta separación indica que este conjunto ha acumulado un número importante de diferencias moleculares. El estudio detallado esta rama es obligatorio porque permitirá asomarnos a los procesos de cambio y mutación que llevaron a la aparición de A (H1N1).

¿Cuándo surgió el virus?

El origen de la epidemia no es lo mismo que el origen del agente causal. Debido a que el virus A (H1N1) cambia con rapidez por tener un genoma de RNA, los datos disponibles a partir de la epidemia de influenza de 1918 nos permiten calcular cuando han ido surgiendo las distintas cepas a partir de datos experimentales sobre su tasa de mutaciones. Al usar el gen PB1, nuestros cálculos indican que el virus A (H1N1) surgió entre Noviembre del 2008 y Enero del 2009, pero otros autores como Michael Worobey han propuesto que surgió entre junio y diciembre del 2008.

Estas diferencias son comprensibles, ya que los cálculos se han hecho usando distintas secuencias y diferentes muestras. Sin embargo, los distintos cálculos sugieren consistentemente la existencia de una fase en la que probabilidad de contagio fue muy pequeña y en donde los sistemas de salud no son capaces de distinguir ésta enfermedad de otras que producen cuadros clínicos similares. Un sistema de monitoreo de enfermos graves o fallecimientos por neumonía y de síntomas relacionados, parecería ser la forma de detección de éste tipo de eventos. Ello sería de importancia considerable para darle un seguimiento adecuado a A (H1N1) o para eventos similares que seguramente se volverán a presentar.

¿La vacuna contra los virus de la influenza estacional aplicada el año pasado brinda protección contra la infección del virus A (H1N1)?

Desde el comienzo de la epidemia, fue notable el observar que el grupo más afectado en a gravedad de la neumonía fuera el de los adultos, mientras que no se reportara lo mismo para los extremos de la edad (niños y ancianos), que tradicionalmente suelen ser los más afectados. Una primera reflexión sugirió que ello se debiera a que el grupo de adultos no recibe la vacuna estacional, la cual pudiera tener un efecto protector. Se debe subrayar que a la fecha no se ha podido demostrar la ausencia de ésta inmunidad cruzada.

Con el propósito de analizar ésta hipótesis, hemos comparado las secuencias de las proteínas hemaglutinina y neuraminidasa de los virus de las vacunas para la influenza estacional, con las de las proteínas homólogas de las cepas del virus A(H1N1) que está circulando en México (Figura 8).

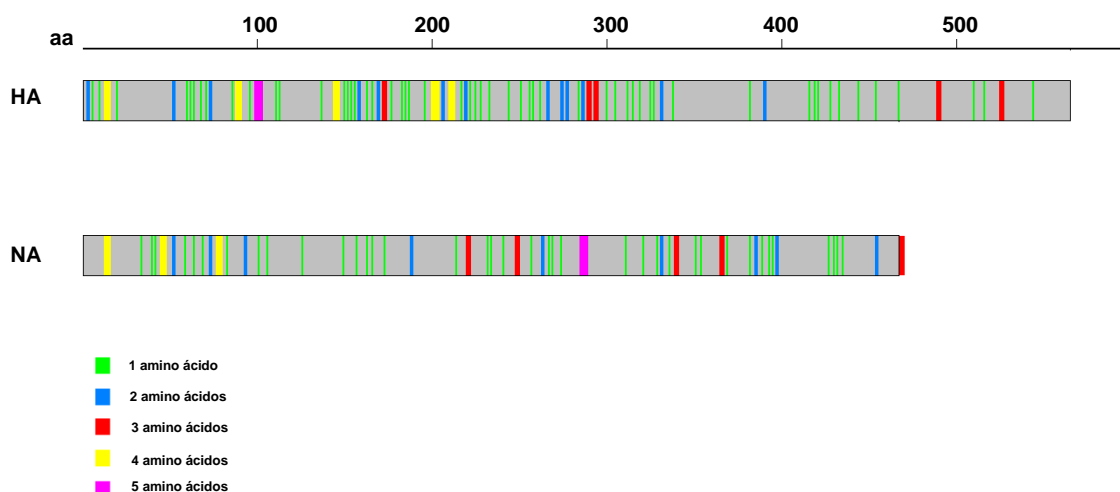


Figura 8. Comparación de las proteínas HA (hemaglutinina) y NA (neuraminidasa) de la cepa A/Brisbane/59/2007(H1N1) utilizadas en la elaboración de la vacuna contra la influenza temporada 2008-2009 con las secuencias de las proteínas de cepas mexicanas de A(H1N1). La barra gris corresponde a las proteínas vacunales, y las barras de colores muestran la cantidad de aminoácidos mutantes de las cepas mexicanas de A (H1N1).

Los resultados obtenidos muestran que las proteínas de los virus vacunales son solamente 80% similares con las de las cepas identificadas en México. Estos cambios o mutaciones se acumulan en diferentes regiones de las proteínas incluyendo aquellas que están expuestas al reconocimiento por los anticuerpos específicos desarrollados por la vacuna y que brindan la protección. Esto implica que son suficientes dos aminoácidos diferentes por cada 10 para tener un elevado margen de certeza de que los anticuerpos inducidos por la vacunación no reconocerán, no se unirán y no inactivarán apropiadamente a las partículas virales. Dada la especificidad de la respuesta inmune mediada por anticuerpos que se unen a las regiones expuestas de la cápside viral no parece haber posibilidades altas para una protección cruzada con los anticuerpos inducidos por la vacunación.

¿Por qué la infección por el virus A (H1N1) ha provocado más muertes en México que en otros países donde se ha detectado?

Se han ofrecido distintas alternativas para explicar éste fenómeno:

- a) no hay aún datos suficientes para afirmar que ello es cierto. Es posible que si se extiende abruptamente la infección en otros países, como ocurrió en México, se pueda observar el mismo fenómeno que en nuestro país;

- b) es probable que las deficiencias en el sistema de salud de nuestro país limitaran el acceso y en tratamiento oportunos en cuando menos algunos casos;
- c) el virus A (H1N1) interacciona con otro agente patógeno como un virus adicional aún no descrito;
- d) la epidemia comenzó con cepas de A (H1N1) agresivas que se han ido atenuando. Esta posibilidad se puede estudiar con los datos de la estructura genética del virus y sus variantes; o bien
- e) estén circulando más de una variedad del virus A (H1N1), y que una de ellas provoque cuadros más graves en los adultos.

Si estos virus tienen tasas de mutación muy elevadas, ¿es posible que aparezcan cepas resistentes a los antivirales que se están usando actualmente?

La evolución biológica nunca se detiene, y los mecanismos de variabilidad genética del A(H1N1) permiten asegurar que surgirán nuevas variantes. Los antivirales disponibles y eficientes para controlar la infección con el virus de la influenza A H1N1 son el oseltamivir (Tamiflu®) y el zanamivir (Relenza®). Existen numerosos reportes que describen las mutaciones del gen que codifica para la proteína neuraminidasa (NA) de varios virus de la influenza. Esta proteína es una enzima que facilita la entrada del virus a las células humanas y es el blanco de estos fármacos.

Hemos revisado las secuencias de proteínas virales asociadas con el incremento en la resistencia a los fármacos. Ello nos ha permitido confirmar la presencia en todas las cepas mexicanas de una mutación asociada con la resistencia al amantadine en el gen que codifica para la proteína M2. La información genética disponible hasta el momento muestra que todas ellas se mantienen sensibles al oseltamivir y al zanamivir, como lo ha confirmado un estudio realizado por el Novel Swine-Origin Influenza A (H1N1) Virus Investigation Team y de los Centers for Disease Control en donde se incluyeron seis cepas mexicanas. A pesar de su aparente sensibilidad, es bien conocido el enorme potencial de propagación que tienen las cepas que adquieren resistencia a antivirales, como la resistencia al oseltamivir que se observó en la temporada anterior. Ello muestra la necesidad de mantener una vigilancia para detectar la aparición de cepas resistentes a la acción de éste antiviral. Se debe poner especial atención a las mutaciones que se produzcan en el gen de la neuraminidasa, en particular, al cambio de una histidina de la posición 275 por una tirosina.

Recomendaciones

Tenemos ante nosotros la responsabilidad histórica de estudiar la aparición de esta epidemia. Sería, irresponsable dejar pasar la oportunidad de investigar

desde todas las perspectivas científicas la biología de este virus y sus implicaciones médicas y sociales. En México hay una comunidad científica madura, que se ha manifestado muy interesada en lo ocurrido hasta el momento. Algunos de estos grupos de investigadores tienen medios y condiciones para trabajar de manera segura con esta entidad biológica. Las aportaciones que puede hacer serán muy apreciadas por la comunidad científica internacional y permitirá estar mejor preparados para la inevitable aparición de este u otro tipo de virus que constantemente aparecen en diferentes partes del mundo. Por ello, proponemos que se tomen acciones que permitan:

1. diseñar un programa de recolección y almacenamiento de muestras que permitan determinar, a nivel nacional, las variantes del virus A (H1N1) para su análisis desde un punto de vista epidemiológico, así como muestras sucesivas de pacientes infectados o enfermos;
2. mejorar los sistemas de vigilancia de patógenos y enfermedades en la producción agropecuaria;
3. establecer programas de colaboración con la comunidad académica nacional que permitan acceder a los materiales biológicos (exudados, RNAs, etc.) para la realización de estudios que permitan entender la manera en que apareció y se desarrolló este brote epidémico.
4. ante la posibilidad de que las cepas aisladas en México presenten una resistencia parcial al tratamiento con oseltamivir (Tamiflu[®]), la comunidad médica responsable de la atención de los casos clínicos deberá estar muy pendiente de los casos que pudieran parecer ser refractarios al tratamiento. En estos casos debe revisarse la posibilidad de centrar el tratamiento con zanamivir (Relenza[®]). Finalmente, es necesario estudiar estrategias para disminuir la posibilidad de mutantes cada vez más resistentes a los fármacos disponibles en la reserva nacional.