

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE YUCATÁN
CENTRO DE INVESTIGACIONES REGIONALES DR. HIDEYO NOGUCHI**

**“MUTACIONES EN LA NEURAMINIDASA DE LA INFLUENZA A(H3N2)
EN MÉXICO (2022): EFECTOS EN SU ACTIVIDAD ENZIMÁTICA E
INTERACCIÓN CON ZANAMIVIR”**

TESIS PARA TITULACIÓN INTEGRAL

INGENIERÍA BIOQUÍMICA

**EGRESADO:
YURI ABIGAIL BALAN CRUZ**

**DIRECTORES:
DRA. GUADALUPE AYORA TALAVERA
DR. IVÁN ALFREDO ESTRADA MOTA**

Calkiní, Campeche, México 2025

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE YUCATÁN
CENTRO DE INVESTIGACIONES REGIONALES DR. HIDEYO NOGUCHI**

**“MUTACIONES EN LA NEURAMINIDASA DE LA INFLUENZA A(H3N2)
EN MÉXICO (2022): EFECTOS EN SU ACTIVIDAD ENZIMÁTICA E
INTERACCIÓN CON ZANAMIVIR”**

TESIS PARA TITULACIÓN INTEGRAL

INGENIERÍA BIOQUÍMICA

**EGRESADO:
YURI ABIGAIL BALAN CRUZ**

**DIRECTORES:
DRA. GUADALUPE AYORA TALAVERA
DR. IVÁN ALFREDO ESTRADA MOTA**

Calkiní, Campeche, México 2025



Instituto Tecnológico Superior de Calkini
Subdirección de Planeación y Desarrollo

Instituto Tecnológico Superior de Calkini
Departamento de Administración y
Apoyo al Estudiante

Calkini, Campeche 45943
P/10/25/798
INGENIERÍA BIOQUÍMICA

CONSTANCIA DE NO INCONVENIENCIA

MODALIDAD: TESIS

C. YURI ABIGAIL BALAN CRUZ 6845
PASANTE DE LA CARRERA DE
INGENIERÍA BIOQUÍMICA.
PRESENTE

Con relación a lo establecido en el Reglamento de Estudios de Licenciatura, capítulo VII, fracción I, vigente en este Instituto, y una vez emitido el fallo favorable por el director DR, GUADALUPE AYORA TALAVERA, y el co-director DR. IVAN ALFREDO ESTRADA MOTA, respectivamente, este Instituto consta de no tener inconveniencia para la realización del acto protocolario de titulación integral de su trabajo profesional titulado: **"MUTACIONES EN LA NEURAMINIDASA DE LA INFLUENZA A(H3N2) EN MÉXICO (2022): EFECTOS EN SU ACTIVIDAD ENZIMÁTICA E INTERACCIÓN CON ZANAMIVIR"**.

ATENTAMENTE

Excelencia en Educación Tecnológica®
Sabiduría, Fortaleza de Nuestra Cultura®



INSTITUTO TECNOLÓGICO SUPERIOR
DE CALKINI
"DEPARTAMENTO DE ADMINISTRACIÓN
ESCOLAR Y APOYO A
ESTUDIANTES"

Dr. Jorge Alfonso Hau Puc.
Departamento de Administración y
Apoyo al Estudiante.

CLAVE: 04MSU0013P
CALKINI, CAMPECHE, MÉXICO.

C.c.p. Archivo



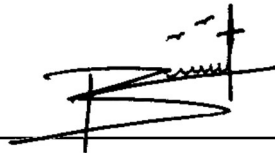
2025
Año de
La Mujer
Indígena

Av. Ah Canul S/N por Carretera Federal, Calkiní, Campeche,
C.P. 24900 Tel. 996-8134870,
e-mail: se_dcalkini@tecnm.mx | itescam.edu.mx



CARTA DE CESIÓN DE DERECHOS DE AUTOR

El que suscribe, autoriza por medio del presente escrito al Instituto Tecnológico Superior de Calkiní (ITESCAM) para que utilice tanto física como digitalmente la tesis de Licenciatura denominada “MUTACIONES EN LA NEURAMINIDASA DE LA INFLUENZA A(H3N2) EN MÉXICO (2022): EFECTOS EN SU ACTIVIDAD ENZIMÁTICA E INTERACCIÓN CON ZANAMIVIR”, de la cual soy autor y titular de los Derechos de Autor. La finalidad del uso por parte del Instituto Tecnológico Superior de Calkiní en el estado de Campeche de la tesis antes mencionada será única y exclusivamente para difusión, educación y sin fines de lucro; autorización que se hace de manera enunciativa más no limitativa para subirla a la Red Abierta de Bibliotecas Digitales y a cualquier otra red académica con las que la Universidad tenga relación institucional. Por lo antes manifestado, libero al ITESCAM de Cualquier reclamación legal que pudiera ejercer respecto al uso y manipulación de la tesis mencionada y para los fines estipulados en este documento. Se firma la presente autorización en la ciudad de Mérida, Yucatán a los catorce días del mes de octubre del año dos mil veinticinco.

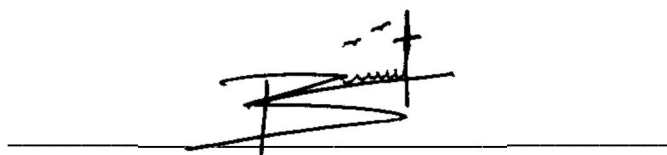


YURI ABIGAIL BALAN CRUZ

DECLARACIÓN DE PROPIEDAD TESIS

Declaro que la información contenida en la sección de materiales y métodos experimentales, los resultados y discusión de este documento, proviene de las actividades de experimentación realizadas durante el período que se me asignó, para desarrollar mi trabajo de tesis, en el laboratorio de Virología del Centro de Investigaciones Regionales Dr. Hideyo Noguchi, y que dicha información le pertenece en términos de la Ley de la Propiedad Industrial, por lo que no me reservo ningún derecho sobre ello.

Lugar y fecha: Mérida, Yucatán a 14 de octubre de 2025

A handwritten signature in black ink, consisting of stylized, overlapping loops and a vertical line, positioned above a horizontal line.

YURI ABIGAIL BALAN CRUZ

“Pobres, pero enriqueciendo a muchos; como los que no tienen nada, pero lo poseen
todo”

DEDICATORIA

A Dios, a mi familia, a Plutón, a mis sueños y a mí.

AGRADECIMIENTOS

Al Centro de Investigaciones Regionales Dr. Hideyo Noguchi, por brindarme la oportunidad de realizar esta investigación y, sobre todo, por permitirme conocer a personas maravillosas que llevaré siempre conmigo. En especial, al equipo del laboratorio de Virología: gracias por su apoyo incondicional, por su amistad y por motivarme a seguir adelante. Todo lo que aprendí de ustedes forma parte de este trabajo y de quien soy.

A la Dra. Guadalupe Ayora Talavera, quien además de ser una brillante investigadora, es una gran mujer, madre y amiga. Le agradezco por abrirme un espacio en su grupo y por confiar en mí incluso cuando yo misma dudaba. Mi gratitud es profunda, no solo como su estudiante, sino como aquella joven que, gracias a usted, descubrió y aprendió a amar la ciencia.

Al Dr. Iván Estrada Mota, por guiarme por el camino correcto, por abrirme las puertas del mundo de la investigación.

A mi familia: a mi padre Francisco Balan, mi madre Maribel Cruz, mi hermano Javier Balan, mi tía Rosario Cruz, mi prima Azucena Gonzalez, mi tío César Cruz, mi abuelo Antonio Cruz y mis abuelas Natividad Chávez y Ana Farfán. Quienes nunca dudaron en apoyarme para construir mis sueños. Porque aun teniendo nada me lo dieron todo. Gracias por el amor y los valores que me han inculcado.

Y, finalmente, a mí misma, por permitirme seguir un día más.

ÍNDICE

RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN	2
CAPÍTULO I.....	3
ANTECEDENTES.....	3
1. VIRUS DE INFLUENZA	3
1.1. Clasificación taxonómica y características generales.....	3
1.2. Morfología y estructura viral.....	4
1.3. Ciclo de replicación.....	5
1.4. Epidemiología y circulación estacional del subtipo A(H3N2).....	7
1.5. Antivirales contra la influenza.....	9
2. BIOLOGÍA MOLECULAR DE LA NEURAMINIDASA N2	13
2.1. Estructura y función bioquímica de la neuraminidasa.....	14
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	20
HIPÓTESIS.....	22
JUSTIFICACIÓN	23
OBJETIVO GENERAL	24
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	24
CAPÍTULO II	25
METODOLOGÍA	25
Etapas I: Diseño <i>in silico</i> de oligonucleótidos específicos para el gen NA.....	25
Etapas II: Secuenciación del gen NA	26
Extracción de ARN viral.....	26
Amplificación por RT-PCR	28
Purificación del producto de PCR.....	28
Secuenciación.....	29
Etapas III: Análisis y modelamiento de la proteína NA	29
Identificación de mutaciones.....	29
Docking Molecular.....	30
CAPÍTULO III	32
RESULTADOS.....	32
Diseño <i>in silico</i> de oligonucleótidos específicos para el gen NA	32
Identificación de mutaciones en el gen NA de aislados virales de H3N2.....	33
Análisis de acoplamiento molecular.....	37
DISCUSIÓN	44
CONCLUSIONES	47
BIBLIOGRAFÍA.....	48

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Rango de hospedero de cada tipo de virus de influenza. Los VIA presentan un amplio espectro de hospederos (amarillo) en comparación a los virus de influenza B (verde), C (azul) y D (rosa). Obtenido y modificado de (Skelton & Huber, 2022).....	3
Figura 2. Proteínas del virus de Influenza A. Cada proteína señala el segmento que lo codifica, su nombre, código en el PDB y función. Elaborado con Power Point.	4
Figura 3. Estructura del ácido siálico. Los virus de la influenza humana se unen preferentemente al ácido siálico unido a la galactosa mediante un enlace $\alpha 2,6$. Obtenido y modificado de (Kuchipudi et al., 2021).....	5
Figura 4. Ciclo de replicación del virus de Influenza A. Elaborado con BioRender.	7
Figura 5. Periodo estacional e interestacional de la influenza en México. el sistema de vigilancia epidemiológica nacional divide el año en dos periodos: temporada estacional (semana epidemiológica 40 a la 20) y temporada interestacional (semana 21 a 39). La primera se corresponde al período de alta circulación viral y aumento de casos graves, mientras que la segunda a la reducción y detección esporádica del número de casos. Tomado y modificado de (Canul, 2024).....	8
Figura 6. (Izquierda) Curva epidémica de casos confirmados de influenza por semana epidemiológica, durante la temporada 2022-2023 (línea roja) en comparación con las cinco temporadas anteriores (2017-2022). (Derecha) Circulación de virus de influenza en México durante la temporada estacional 2022-2023, destacando el predominio del subtipo AH3N2 (cian) en el total de casos positivos. (DGE, 2022).	9
Figura 7. Ciclo de vida del virus de la influenza A y mecanismos de acción de los principales antivirales. Se indica el punto de interferencia de los inhibidores de M2 (amantadina y rimantadina), inhibidores de cap-snatching (baloxavir marboxil) e inhibidores de la neuraminidasa (oseltamivir y zanamivir). Tomado y modificado de (Kumari et al., 2023).	10
Figura 8. Estructura química de los inhibidores de neuraminidasa: zanamivir (izquierda) y oseltamivir (derecha). Ambas moléculas son análogos estructurales del ácido siálico, lo que les permite unirse al sitio activo de la neuraminidasa viral e inhibir su función catalítica (PDB, 2020).	11

Figura 9. Ensayos de inhibición de la NA. Ensayo de fluorescencia: El sustrato sintético MUNANA (2'-(4-metilumbeliferil)- α -D-N-acetilneuramínico) es hidrolizado por la neuraminidasa para liberar N-acetil-a-D-neuramínico y 4 metilumbeliferona (4-MU). Ensayo de quimioluminiscencia: El sustrato na-Star es clivado enzimáticamente liberando N-acetil-a-D-neuramínico y un compuesto quimioluminiscente. Obtenido y modificado de (Singh et al., 2019).
..... 13

Figura 10. Estructura de la neuraminidasa. La NA es una proteína de membrana homotetramérica que consta de un dominio de cabeza (PDB 7U4G), un dominio de tallo, un dominio transmembrana y una cola citoplasmática. Obtenido y modificado de (Cretyens et al., 2021) .. 15

Figura 11. Secuencia de los aminoácidos de la proteína neuraminidasa del virus de la influenza. Se muestra la región que forma la cola citoplasmática, el dominio transmembrana, el tallo y la cabeza globular. Las seis láminas β antiparalelas de 4 hebras, dispuestas como las palas de una hélice, están marcadas y coloreadas en magenta, rojo, verde, amarillo, azul y naranja. Los sitios de unión a fármacos están resaltados y coloreados en azul. Obtenido de (Jagadesh et al., 2016).
..... 16

Figura 12. Vista superior del dominio catalítico de la neuraminidasa. El dominio catalítico de la neuraminidasa se divide en cuatro subunidades denominados monómeros, cada uno de ellos posee un sitio catalítico funcional y dos sitios de unión para iones de calcio (PDB: 4GZQ). Visualización generada en PyMOL..... 17

Figura 13. Ácido siálico unido al sitio activo de la Neuraminidasa N2 (PDB:4GZQ). Se observa el sitio activo conformado por los residuos R118, D151, R152, R224, E276, R292, R371 e Y406 (cian), el ion de Ca^{2+} (verde) y las moléculas de agua (rojo). Visualización generada en PyMOL.
..... 17

Figura 14. Representación del complejo entre zanamivir y el sitio activo de la neuraminidasa (PDB:4U7G) se muestran las interacciones de tipo enlace de hidrógeno (líneas punteadas amarillas) entre el grupo carboxilo y la tríada de argininas (Arg118, Arg292, Arg371), así como las interacciones adicionales del grupo guanidinio con los residuos Asp151 y Glu227. También se observan residuos cercanos relevantes como Glu276 y Trp178, moléculas de agua (esferas rojas) y un ion cloruro (esfera verde). Visualización generada en PyMOL..... 18

Figura 15. Etapas metodológicas del estudio. (a) Diseño y síntesis de oligonucleótidos. (b) Secuenciación del gen NA. (c) Análisis y modelamiento de la proteína NA..... 25

Figura 16. Representación esquemática del gen de neuraminidasa del virus A(H3N2), mostrando el dominio catalítico (en azul), la ubicación de los oligonucleótidos diseñados Fw1 (anaranjado), Fw2 (verde) y Rv1 (morado). Las flechas señalan el fragmento amplificado por cada oligonucleótido.....	32
Figura 17. Electroforesis en gel de agarosa del productos amplificado del gen NA del virus de influenza A(H3N2).....	34
Figura 18. Árbol filogenético de la neuraminidasa H3N2 Árbol filogenético de cepas del virus de influenza A/H3N2 generado mediante la plataforma Nextstrain. Se muestran las relaciones evolutivas entre secuencias virales recolectadas en distintas regiones de México (resaltadas) y la cepa vacunal de referencia A/Darwin/9/2021. Las secuencias 11708_Chihuahua, 11152_Sonora, 11774_Jalisco y 11325_Querétaro se indican en negritas para destacar su ubicación filogenética relativa. Los clados B.2 (en rosa) y B.3 (en amarillo) representan diferentes linajes virales circulantes. La distancia genética entre cepas locales y la cepa vacunal sugiere variabilidad en la posible eficacia de la inmunización regional. Visualización generada en FigTree.....	36
Figura 19. Interacciones de la molécula 7U4G con el zanamivir (ZMR).	38
Figura 20. Sistema del receptor. Neuraminidasa 7U4G_150, ion de Ca^{2+} y molécula de HOH 623.	38
Figura 21. Caja de acoplamiento molecular utilizada en el cálculo de docking. Los colores rojo, verde y azul corresponden a las dimensiones de la caja en los ejes x, y y z, respectivamente ...	39
Figura 22. Confórmeros del ligando cristalizado ZMR obtenidos en el cálculo de docking con AutoDock Vina.	40
Figura 23. Validación del redocking. a) Superposición entre la conformación cristalográfica del zanamivir (coloración CPK) y la pose predicha de mayor afinidad obtenida en AutoDock Vina (en color verde), con un valor de RMSD de 1.24 Å. b) superposición de la proteína cristalizada 7U4G (rosado) y la proteína generada por este estudio (verde) con valor de RMSD de 0.43 Å. Validación y visualización generada por VMD.	41
Figura 24. Representación tridimensional (a, c) y bidimensional (b, d) del complejo neuraminidasa–zanamivir del PDB 7U4G (a, b) y la proteína de NA 7U4G_150 (c, d), obtenida en Discovery Studio Visualizer BIOVIA. (a, c) En la representación tridimensional el ligando (zanamivir) se muestra en color gris en el centro de la cavidad catalítica. La superficie de la proteína resalta las regiones aceptoras (verde) y donadoras (magenta) de enlaces de hidrógeno. Se observan residuos clave en la interacción y una molécula de agua intrínseca (HOH:623)	

participando en la red de enlaces. (b, d) En el mapa bidimensional los enlaces de hidrógeno convencionales se muestran en verde, los puentes salinos en naranja, y los enlaces mediados por agua en azul..... 42

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Criterios propuestos por el AVW G (Expert Working Group on Surveillance of Influenza Antiviral Susceptibility) de la OMS para la susceptibilidad a inhibidores de la neuraminidasa (NI), con fines de vigilancia y notificación.....	12
Tabla 2. Valores de IC ₅₀ obtenidos en ensayos de inhibición de la neuraminidasa con zanamivir y oseltamivir en aislamientos de influenza A(H3N2) de México, 2022. Se destacan los valores atípicos respecto a los controles sensibles.	27
Tabla 3. Características de los cebadores diseñados para PCR	32
Tabla 4. Propiedades termodinámicas y especificidad de los oligonucleótidos diseñados	33
Tabla 5. Cobertura y porcentaje de identidad de las secuencias consenso obtenidas mediante secuenciación Sanger y analizadas por BLASTN	34
Tabla 6. Mutaciones detectadas por muestra (comparación con A/Darwin/9/2021) ..	35
Tabla 7. Listado de mutaciones de las secuencias mexicanas de NA (2021–2022) con respecto a la cepa vacunal A/DARWIN/9/2021.....	35
Tabla 8. Energías de unión y desviaciones RMSD de las conformaciones generadas por AutoDock Vina para el complejo neuraminidasa–zanamivir.....	39

ABREVIATURAS Y SIGLAS

aa: Aminoácidos

ARN: Ácido ribonucleico

ARNm: Ácido ribonucleico mensajero

ARNv: Ácido ribonucleico viral

HA: Hemaglutinina

Kb: Kilobase

M1: Proteína de matriz

M2: Proteína de canal iónico

NA: Neuraminidasa

NP: Nucleoproteína

NS1: Proteína no estructural

NS2/NEP: Proteína de exportación nuclear

PA: Proteína ácida

PB1: Proteína básica 1

PB2: Proteína básica 2B

PDB: Protein Data Bank

RESUMEN

La influenza A subtipo H3N2 constituye una de las principales causas de morbilidad y mortalidad asociadas a la influenza estacional a nivel mundial. En México, durante la temporada 2022, se identificaron aislamientos virales con valores atípicos de concentración inhibitoria media (IC_{50}) frente al antiviral zanamivir, lo que sugiere la posible presencia de mutaciones en el gen de la neuraminidasa (NA) capaces de modificar su afinidad por este fármaco. El presente estudio tuvo como objetivo identificar mutaciones en la NA de cepas mexicanas de A(H3N2) y evaluar su impacto potencial sobre la estructura enzimática y la interacción con zanamivir. Para ello, se diseñaron oligonucleótidos específicos dirigidos al dominio globular de NA, se amplificó y secuenció el fragmento correspondiente mediante el método de Sanger, y se realizó un análisis comparativo con secuencias de referencia. Las mutaciones identificadas fueron analizadas mediante modelado por homología, acoplamiento molecular y simulaciones computacionales, con el fin de predecir su efecto en la estabilidad conformacional de la enzima y su interacción con el inhibidor. Los resultados obtenidos aportan evidencia sobre posibles mecanismos moleculares de reducción de sensibilidad a zanamivir en cepas circulantes en México, información relevante para fortalecer la vigilancia genómica y orientar estrategias terapéuticas frente a variantes emergentes de influenza A(H3N2).

INTRODUCCIÓN

La influenza es una enfermedad respiratoria aguda de alta transmisibilidad, causada por virus de la familia Orthomyxoviridae. El subtipo A(H3N2) del virus de influenza A se asocia a brotes estacionales recurrentes con elevada carga de morbilidad, especialmente en niños pequeños, adultos mayores y personas con comorbilidades. Su elevada capacidad de mutación y recombinación facilita la aparición de variantes con modificaciones antigénicas y funcionales que pueden comprometer tanto la eficacia vacunal como la respuesta a antivirales.

Entre las proteínas de superficie del virión, la NA desempeña un papel fundamental en la liberación de nuevas partículas virales, escindiendo residuos terminales de ácido siálico en las glicoproteínas del hospedero. Debido a esta función crítica, la NA es una diana terapéutica de alto valor, siendo inhibida por fármacos como zanamivir y oseltamivir. Sin embargo, la presión selectiva ejercida por el uso de estos antivirales ha favorecido la emergencia de cepas con susceptibilidad reducida, principalmente debido a mutaciones en el sitio activo o en regiones adyacentes de la NA que afectan la interacción fármaco-enzima.

Durante la temporada estacional de influenza 2022 en México, se detectaron aislamientos de A(H3N2) con valores de IC_{50} frente a zanamivir significativamente superiores a los observados en cepas sensibles, lo que sugiere la presencia de alteraciones moleculares asociadas a resistencia. El presente trabajo aborda este fenómeno mediante un enfoque integral que combina técnicas de biología molecular, secuenciación genómica y modelado estructural, con el propósito de caracterizar las mutaciones presentes en la neuraminidasa de estas cepas y predecir su impacto sobre la afinidad por zanamivir. Estos hallazgos buscan contribuir al entendimiento de los mecanismos de resistencia antiviral y apoyar la formulación de estrategias de vigilancia y control más efectivas.

CAPÍTULO I

ANTECEDENTES

1. VIRUS DE INFLUENZA

1.1. Clasificación taxonómica y características generales

El virus de la influenza A (VIA), es el principal agente etiológico de la influenza, una enfermedad respiratoria aguda y altamente contagiosa comúnmente denominada “gripe” (Carter & Iqbal, 2024). Es un virus envuelto con genoma de ARN monocatenario en sentido negativo, que se divide en 8 segmentos separados (Nuwarda et al., 2021). Pertenece a la familia *Orthomyxoviridae* (orden *Articulavirales*), género *Alphainfluenzavirus* y se clasifican en subtipos según sus principales antígenos de superficie: hemaglutinina (HA) (18 subtipos, de H1 a H18) y NA (11 subtipos, de N1 a N11) (ICTV, 2025). Actualmente, solo los subtipos H1N1 y H3N2, presentan una transmisión sostenida entre humanos (Knight et al., 2021). No obstante, los VIA tienen un amplio rango de hospederos, infectando aves, que sirven como su reservorio natural, humanos, cerdos, roedores, gatos, caballos e incluso ballenas (Figura 1).

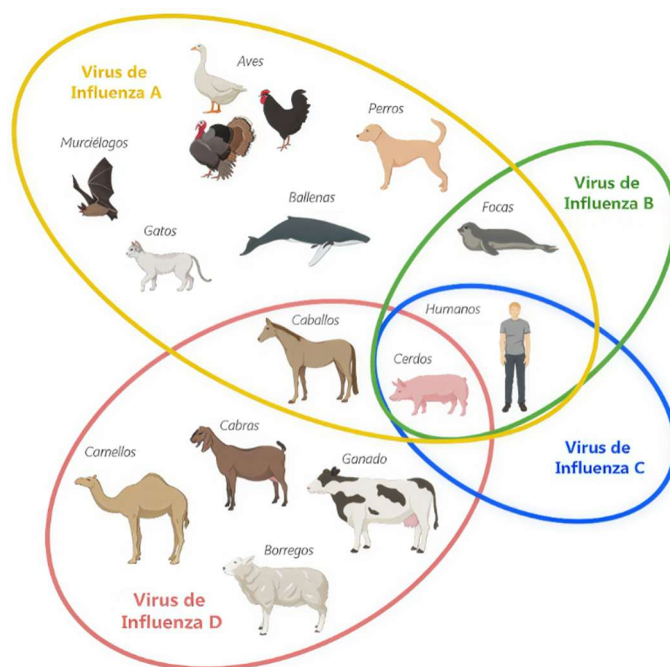


Figura 1. Rango de hospedero de cada tipo de virus de influenza. Los VIA presentan un amplio espectro de hospederos (amarillo) en comparación a los virus de influenza B (verde), C (azul) y D (rosa). Obtenido y modificado de (Skelton & Huber, 2022).

1.2. Morfología y estructura viral

Los VIA, pueden ser filamentosos o esféricos. La morfología filamentososa es típica de los aislados clínicos, mientras que la esférica se ha observado en las cepas de laboratorio (CD, 2025). En su estructura (Figura 2), el virus presenta una envoltura lipídica derivada de la membrana plasmática de la célula huésped, en la cual se insertan las glicoproteínas hemaglutinina y neuraminidasa, así como un menor número de canales iónicos de matriz (M2) (Moreira et al., 2021). Justo debajo de esta membrana se encuentra la matriz M1 que le brinda estructura y soporte (Peukes et al., 2020). En el interior del virión se localizan la proteína de exportación nuclear (NEP o NS2), la proteína no estructural (NS1) y el complejo de ribonucleoproteína (vRNP). Este último está compuesto por los segmentos de ARN viral (ARNv) recubiertos con nucleoproteína (NP) y asociados con la ARN polimerasa que es una enzima heterotrimérica formada por dos subunidades de polimerasa básica (PB1 y PB2) y una subunidad de polimerasa ácida (PA) (Skelton & Huber, 2022). En total, hay ocho vRNP que codifican estas 10 proteínas principales esenciales para la replicación viral (Carter & Iqbal, 2024).

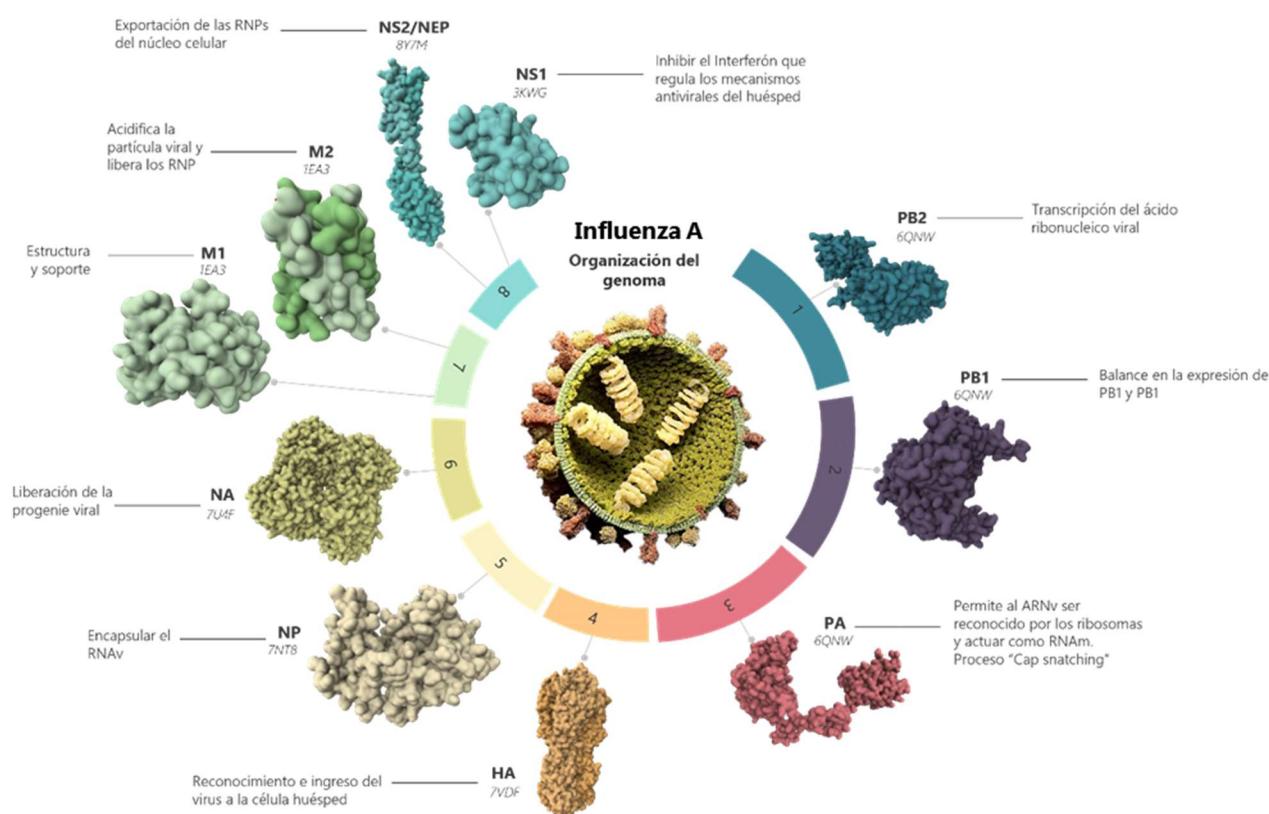


Figura 2. Proteínas del virus de Influenza A. Cada proteína señala el segmento que lo codifica, su nombre, código en el PDB y función. Elaborado con Power Point.

1.3. Ciclo de replicación

El ciclo de replicación del virus de influenza A se divide en tres etapas principales: entrada a la célula huésped; transcripción y posterior replicación del genoma viral; y finalmente, ensamblaje y gemación. A continuación, se describen brevemente las fases que conforman este proceso. La Figura 4 representa el ciclo de replicación del virus de influenza A.

1.3.1. Entrada a la célula huésped

En humanos, la infección del VIA inicia cuando la HA se une a los receptores de ácido siálico (SA) unidos a galactosa mediante enlaces $\alpha 2,6$, presentes en el epitelio traqueal (Figura 3) (Zhao & Pu, 2022). Esta interacción promueve la endocitosis del virión. Una vez en el interior de la célula huésped, el virión es transportado dentro de un endosoma. La acidificación del endosoma activa los canales iónicos M2 e induce un cambio conformacional en la HA, facilitando la fusión de las membranas viral y endosomal. Como resultado, los segmentos de ARNv y sus proteínas asociadas son liberados en el citoplasma (Hernández, 2024).

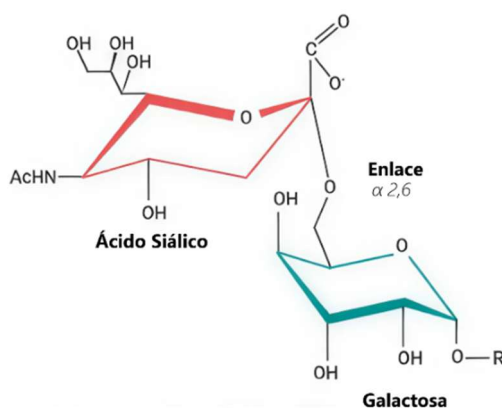


Figura 3. Estructura del ácido siálico. Los virus de la influenza humana se unen preferentemente al ácido siálico unido a la galactosa mediante un enlace $\alpha 2,6$. Obtenido y modificado de (Kuchipudi et al., 2021).

1.3.2. Transcripción y replicación del genoma viral

Una vez en el citoplasma, los vRNP son transportados al núcleo a través del poro nuclear, proceso mediado por las importinas α y β (Hernández Altamirano, 2024).

Dentro del núcleo, la ARN polimerasa viral inicia la transcripción del ARNv para producir ARN mensajero (ARNm). Este proceso se lleva a cabo mediante el mecanismo conocido como “*cap snatching*”, en el cual la maquinaria viral “secuestra” los extremos 5' con caperuza 7-metilguanilada (m7G) de los precursores de ARNm del huésped para utilizarlos como cebadores en la síntesis del ARNm viral (Du et al., 2022).

Los ARNm virales generados son exportados al citoplasma, donde son traducidos por los ribosomas celulares para la síntesis de proteínas virales (Du et al., 2022). Al mismo tiempo, ocurre la replicación del genoma viral. En una primera etapa, el ARNv sirve como molde para sintetizar ARN complementario en sentido positivo (ARNc), el cual se encapsida rápidamente con nucleoproteínas y polimerasas virales para formar complejos complementarios (RNPC). En una segunda etapa, estos RNPC actúan como moldes para generar nuevos ARNv que constituirán el genoma de las partículas virales (Carter & Iqbal, 2024).

Aunque tanto el ARNm como el ARNc son de sentido positivo, existen diferencias estructurales clave: el ARNc carece de una caperuza 5'm7G y de la cola de poliadenina (poli(A)) que sí está presente en los ARNm virales (Carter & Iqbal, 2024).

1.3.3. Ensamblaje y gemación

Los RNPv de progenie son exportados desde el núcleo mediante la acción conjunta de las proteínas NEP y M1 que facilitan su tránsito hacia el citoplasma. Una vez allí, se dirigen hacia la membrana plasmática mediante vesículas de transporte (Zhu et al., 2023). En la membrana plasmática, los ocho segmentos RNPv se ensamblan de manera coordinada, junto con las proteínas estructurales virales previamente insertadas: HA, NA y M2 (Hernández, 2024).

La gemación ocurre cuando estas proteínas se acumulan en regiones específicas de la membrana, generando una curvatura que da lugar a la formación del virión (Carter & Iqbal, 2024). Finalmente, la NA escinde los residuos de SA de la superficie celular, lo cual evita la re-agregación de los viriones y facilita su liberación desde la célula huésped (Du et al., 2022).

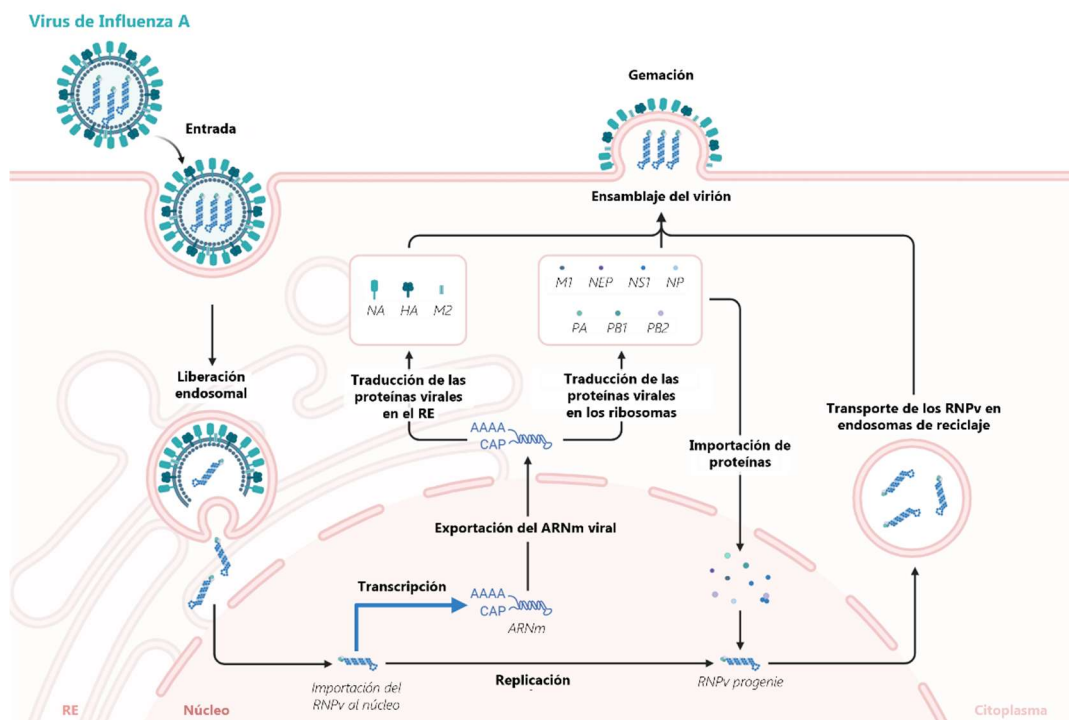


Figura 4. Ciclo de replicación del virus de Influenza A. Elaborado con BioRender.

1.4. Epidemiología y circulación estacional del subtipo A(H3N2)

El subtipo A(H3N2) es uno de los principales agentes etiológicos de la influenza estacional a nivel global y en México. Anualmente, causa epidemias asociadas con elevadas tasas de morbilidad y mortalidad, particularmente en poblaciones vulnerables como niños menores de 5 años y adultos mayores de 65 años (Brcko et al., 2023). Las infecciones por este subtipo suelen manifestarse como enfermedades respiratorias de distinta gravedad, con mayor riesgo de complicaciones severas (neumonía, hospitalización) en comparación con otros subtipos virales (Brcko et al., 2023). La vigilancia genómica del virus de influenza desempeña un papel fundamental para comprender la dinámica de su circulación, evolución molecular, y su impacto en la severidad clínica.

1.4.1. Estacionalidad y epidemiología de la influenza en México

La vigilancia estacional del subtipo A(H3N2) permite identificar los periodos de mayor circulación y los impactos clínicos diferenciados que produce, como se observa en el caso de México. Su propagación está determinada por condiciones climáticas, con una mayor eficiencia de transmisión en ambientes fríos y secos (Matsuki et al., 2023). Esto explica su marcada estacionalidad: las epidemias se concentran entre octubre y marzo, con picos entre diciembre y febrero (DGE, 2024). En México, el sistema de vigilancia epidemiológica divide el año en dos periodos clave: temporada estacional (semana epidemiológica 40 a la 20) es el período de alta

circulación viral y aumento de casos graves; y temporada interestacional (semana 21 a 39) se presenta una baja actividad, pero con detección esporádica de casos (figura 5) (DGE, 2024).



Figura 5. Periodo estacional e interestacional de la influenza en México. el sistema de vigilancia epidemiológica nacional divide el año en dos periodos: temporada estacional (semana epidemiológica 40 a la 20) y temporada interestacional (semana 21 a 39). La primera se corresponde al período de alta circulación viral y aumento de casos graves, mientras que la segunda a la reducción y detección esporádica del número de casos. Tomado y modificado de (Canul, 2024).

La gravedad clínica, la duración de los brotes, los grupos etarios más afectados y las tasas de complicaciones (incluyendo hospitalizaciones y mortalidad) varían significativamente entre las distintas temporadas de influenza. Se ha documentado que, durante las temporadas en las que predomina el subtipo A(H3N2), la carga de enfermedad suele ser mayor, con un impacto desproporcionado en niños pequeños y adultos mayores (Boktor y Hafner, 2023).

1.4.2. Temporada de influenza estacional 2022-2023 en México

Las temporadas de influenza estacional 2021–2022 y 2022–2023 fueron de particular interés epidemiológico, ya que mostraron cambios importantes en la circulación del subtipo A(H3N2) tras el impacto de la pandemia por SARS-CoV-2 y los ajustes en las estrategias de vigilancia.

En el año 2022, la circulación de A(H3N2) mostró fluctuaciones en la cantidad de casos y defunciones. En la temporada estacional 2021-2022 se registraron 3,081 casos y 130 defunciones totales de los cuales 2,796 casos y 118 defunciones (90.74% y 90.8%) correspondieron a H3N2 consolidándose como el subtipo predominante frente a A(H1N1) y B. Para la temporada 2022-2023, A(H3N2) alcanzó su punto más alto, con 8,324 casos (84.3%) y 246 fallecimientos, lo que representó un notable incremento respecto a la temporada anterior (figura 6).

Estos datos no solo consolidan a A(H3N2) como el principal subtipo circulante en el país durante ambos periodos, sino que también resaltan la necesidad de estrategias de vigilancia genómica y farmacológica más precisas para mitigar su impacto clínico y epidemiológico.

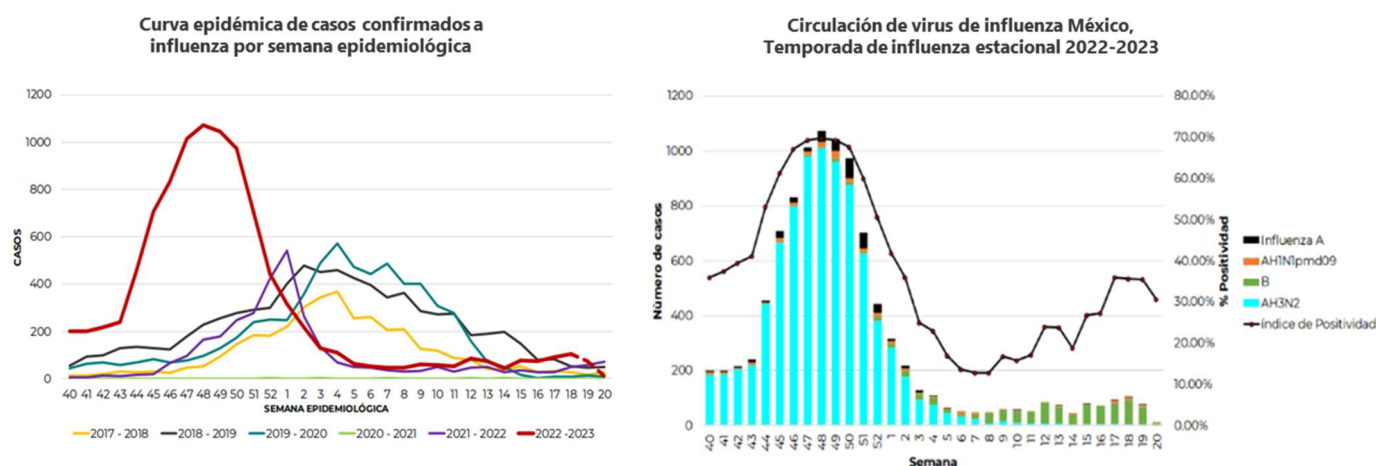


Figura 6. (Izquierda) Curva epidémica de casos confirmados de influenza por semana epidemiológica, durante la temporada 2022-2023 (línea roja) en comparación con las cinco temporadas anteriores (2017-2022). (Derecha) Circulación de virus de influenza en México durante la temporada estacional 2022-2023, destacando el predominio del subtipo AH3N2 (cian) en el total de casos positivos. (DGE, 2022).

1.5. Antivirales contra la influenza

Las vacunas constituyen el pilar fundamental en la prevención de la influenza. No obstante, su efectividad puede verse limitada por coberturas de vacunación insuficientes, problemas de distribución o desajustes antigénicos entre las cepas vacunales y las circulantes (Kumari et al., 2023).

En estos escenarios, los antivirales representan una estrategia complementaria, tanto profiláctica como terapéutica, útil para reducir la morbilidad y la mortalidad asociadas, especialmente en poblaciones de alto riesgo como adultos mayores, niños pequeños y personas inmunocomprometidas (Kumari et al., 2023).

Estos fármacos actúan sobre distintas etapas del ciclo de replicación viral, interfiriendo con la entrada, transcripción o liberación de los viriones, lo que limita la progresión de la infección. Se clasifican en tres clases: los inhibidores del canal iónico M2 (amantadina y rimantadina), los inhibidores del mecanismo *cap-snatching* (como baloxavir marboxil), y los inhibidores de la neuraminidasa (oseltamivir y zanamivir) (Singh et al., 2023).

Actualmente, el uso clínico de los inhibidores M2 ha sido discontinuado debido a la alta prevalencia de cepas resistentes, en particular del subtipo A(H3N2). Por ello, los inhibidores de la neuraminidasa y, más recientemente, baloxavir marboxil, son las opciones terapéuticas recomendadas por la OMS y los CDC.

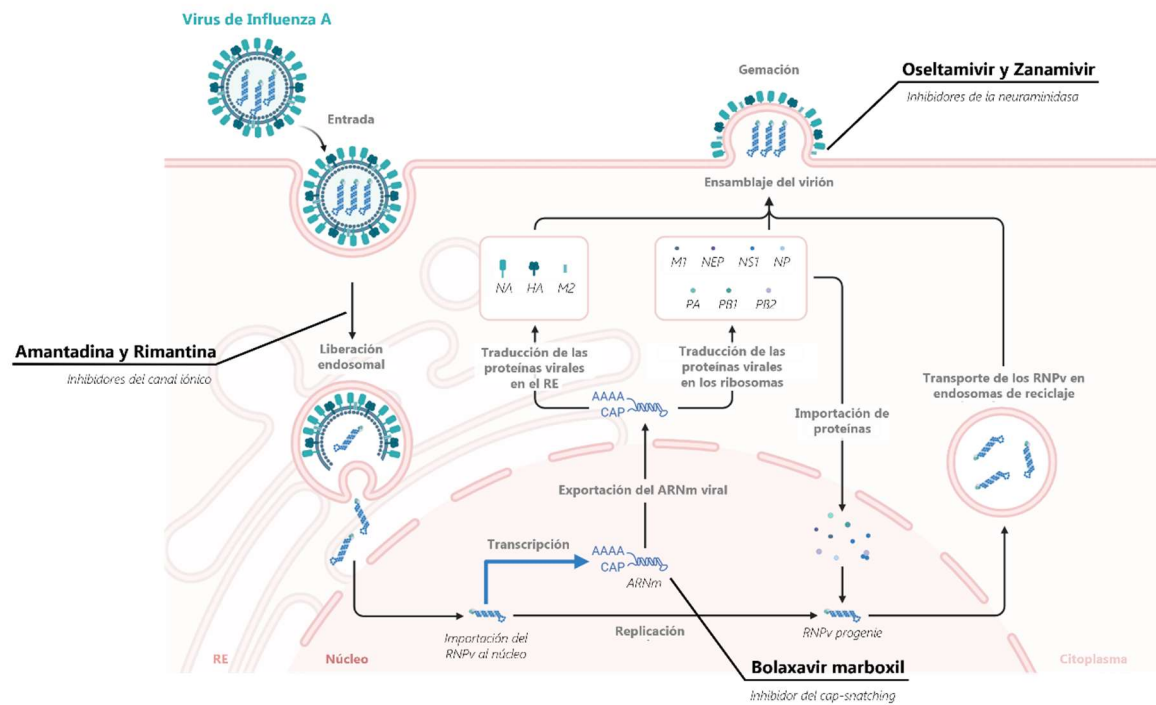


Figura 7. Ciclo de vida del virus de la influenza A y mecanismos de acción de los principales antivirales. Se indica el punto de interferencia de los inhibidores de M2 (amantadina y rimantadina), inhibidores de cap-snatching (baloxavir marboxil) e inhibidores de la neuraminidasa (oseltamivir y zanamivir). Tomado y modificado de (Kumari et al., 2023).

1.5.1. Inhibidores de neuraminidasa: oseltamivir y zanamivir

En México, los antivirales de primera línea utilizados para el tratamiento de la influenza A y B son los inhibidores de la neuraminidasa (NAI, por sus siglas en inglés), oseltamivir y zanamivir (CENETEC, 2020). Estos fármacos se recomiendan dentro de las primeras 48 horas tras el inicio de los síntomas, ya que este periodo coincide con el pico de replicación viral en el tracto respiratorio que ocurre entre las 24 y 72 horas posteriores a la infección (CENETEC, 2020; Świerczyńska et al., 2022).

Oseltamivir se administra por vía oral a una dosis de 75 mg cada 12 horas durante cinco días. Zanamivir, por su parte, se utiliza por vía inhalatoria a razón de 10 mg cada 12 horas durante el mismo periodo. La dosis puede requerir ajustes en poblaciones específicas, como pacientes pediátricos o adultos mayores (CENETEC, 2020).

A nivel molecular, oseltamivir y zanamivir son análogos estructurales del ácido siálico, el sustrato natural de la neuraminidasa viral. Esta similitud les permite unirse al sitio activo de la enzima, actuando como inhibidores competitivos. Al bloquear esta región funcional, impiden la escisión de los residuos terminales de ácido siálico en las glicoproteínas de la célula huésped, lo

cual interfiere con la liberación de los nuevos viriones y, en consecuencia, limita su propagación hacia otras células epiteliales del tracto respiratorio (Lampejo, 2020).

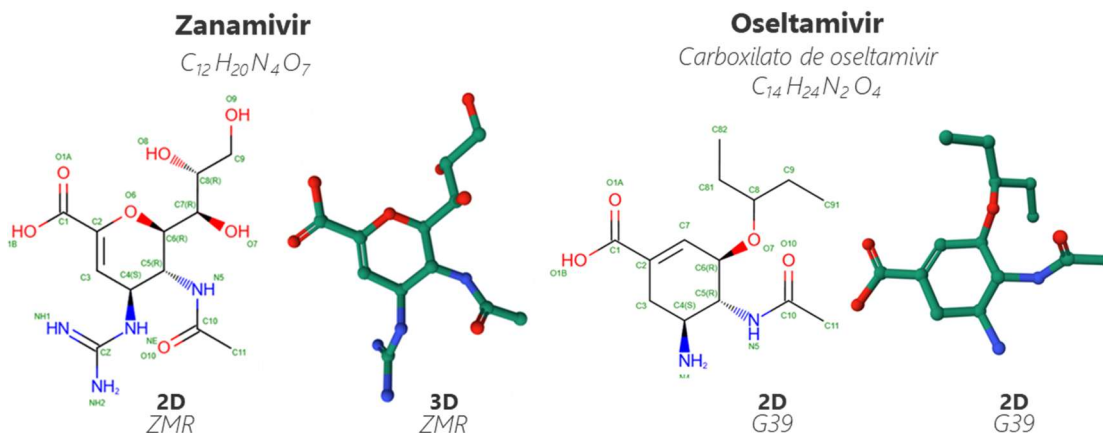


Figura 8. Estructura química de los inhibidores de neuraminidasa: zanamivir (izquierda) y oseltamivir (derecha). Ambas moléculas son análogos estructurales del ácido siálico, lo que les permite unirse al sitio activo de la neuraminidasa viral e inhibir su función catalítica (PDB, 2020).

El fosfato de oseltamivir es un profármaco que requiere activación hepática para convertirse en su forma activa, el oseltamivir carboxilato, responsable del efecto antiviral (NIDDK, 2020). Por el contrario, zanamivir no requiere modificación metabólica para ejercer su acción. El oseltamivir fue aprobado en Estados Unidos en 1999 bajo el nombre comercial Tamiflu, mientras que el zanamivir fue autorizado ese mismo año con el nombre comercial Relenza (Świerczyńska et al., 2022; NIDDK, 2020).

No obstante, la efectividad de estos antivirales puede verse comprometida por la aparición de cepas virales con mutaciones en la neuraminidasa, lo que será abordado en el siguiente apartado.

1.5.2. Mecanismos de resistencia y presión selectiva

El uso intensivo de los NAI ejerce presión selectiva sobre los virus de influenza, favoreciendo la emergencia de variantes resistentes (Meseko et al., 2023). En particular, el H3N2 muestra una elevada tasa de cambio evolutivo, atribuible a su rápida replicación y a una tasa de error estimada en aproximadamente un error por genoma por ciclo de replicación. Cuando surge una variante con resistencia durante la exposición al fármaco, esta adquiere una ventaja selectiva frente a las cepas sensibles (Holmes et al., 2021).

La resistencia a los NAI se debe generalmente a sustituciones de aminoácidos en el gen de NA, especialmente en el sitio activo de la enzima, que reducen la afinidad por el antiviral sin comprometer significativamente la función enzimática (Lampejo, 2020). Estas sustituciones

alteran la sensibilidad a los NAI de manera específica según el fármaco y el subtipo de NA (Rabie-Rudsari et al., 2024). Por ejemplo, En los virus H3N2, dos sustituciones diferentes, E119V y R292K, resultan en resistencia a múltiples NAI y se detectan con mayor frecuencia bajo presión de NAI (Holmes et al., 2021).

1.5.3. Relevancia clínica y vigilancia molecular

En el contexto clínico y epidemiológico, el término “resistencia” suele emplearse para describir variantes virales de influenza con una menor respuesta a los antivirales. Sin embargo, desde un enfoque molecular, es más preciso referirse a ellas como variantes con *susceptibilidad reducida*, ya que la respuesta antiviral no es dicotómica. La mayoría de las mutaciones no confieren una resistencia absoluta, sino una disminución gradual de la susceptibilidad, que puede variar desde efectos clínicamente irrelevantes hasta una pérdida completa de eficacia del tratamiento (Holmes et al., 2021).

Para cuantificar esta susceptibilidad, se emplean ensayos fenotípicos *in vitro*, los cuales determinan la concentración del antiviral necesaria para inhibir la actividad enzimática de la neuraminidasa o limitar la replicación viral. Con base en estos resultados, los virus se clasifican según la Organización Mundial de la Salud como de susceptibilidad normal, reducida o altamente reducida (WHO, 2023; Holmes et al., 2021).

Tabla 1.

Criterios propuestos por el AVWG (Expert Working Group on Surveillance of Influenza Antiviral Susceptibility) de la OMS para la susceptibilidad a inhibidores de la neuraminidasa (NI), con fines de vigilancia y notificación.

Clasificación	Abreviatura	Influenza A
Inhibición normal	NI	<10 veces por encima de la inhibición normal
Inhibición reducida	RI	10 a 100 veces por encima de la inhibición normal
Inhibición altamente reducida	HRI	>100 veces por encima de la inhibición normal

Nota. Traducción y adaptación de *WHO AVWG Proposed NI Susceptibility Criteria for Surveillance and Reporting*, por World Health Organization. © World Health Organization, 2025.

El método más ampliamente utilizado para evaluar la actividad de la neuraminidasa es el ensayo de inhibición enzimática basado en fluorescencia con el sustrato MUNANA (ácido 2'-(4-metilumbeliferil)- α -D-N-acetilneuramínico). La escisión de este compuesto por la neuraminidasa libera metilumbeliferona, un producto fluorescente cuya intensidad se correlaciona con la actividad enzimática. Alternativamente, el ensayo NA-Star utiliza un sustrato quimioluminiscente estructuralmente similar (ISIRV, 2024; Do et al., 2024) (figura 9).

Ambos métodos permiten monitorear cambios en la susceptibilidad antiviral con alta sensibilidad, y se complementan con análisis genotípicos que identifican mutaciones clave asociadas a resistencia. La integración de estos enfoques en los programas de vigilancia molecular resulta esencial para la detección temprana de variantes emergentes, el ajuste de estrategias terapéuticas y la toma de decisiones en salud pública.

Figura 9. Ensayos de inhibición de la NA. Ensayo de fluorescencia: El sustrato sintético MUNANA (2'-(4-metilumbeliferil)- α -D-N-acetilneuramínico) es hidrolizado por la neuraminidasa para liberar N-acetil-a-D-neuramínico y 4 metilumbeliferona (4-MU). Ensayo de quimioluminiscencia: El sustrato na-Star es clivado enzimáticamente liberando N-acetil-a-D-neuramínico y un compuesto quimioluminiscente. Obtenido y modificado de (Singh et al., 2019). Ambos métodos permiten monitorear cambios en la susceptibilidad antiviral con alta sensibilidad, y se complementan con análisis genotípicos que identifican mutaciones clave asociadas a resistencia. La integración de estos enfoques en los programas de vigilancia molecular resulta esencial para la detección temprana de variantes emergentes, el ajuste de estrategias terapéuticas y la toma de decisiones en salud pública.

Dado el papel central de la neuraminidasa tanto en la patogénesis viral como en la respuesta a tratamientos antivirales, su estudio detallado a nivel estructural y funcional resulta clave para interpretar los hallazgos derivados de la vigilancia molecular y los ensayos de susceptibilidad descritos anteriormente.

2. BIOLOGÍA MOLECULAR DE LA NEURAMINIDASA N2

La neuraminidasa del virus de influenza A(H3N2) es una exo- α -sialidasa perteneciente a la familia de las hidrolasas glicosídicas, cuya función principal es catalizar la escisión de los residuos terminales de ácido siálico (N-acetilneuramínico) presentes en las glicoproteínas y glicolípidos de la superficie celular. Esta hidrólisis ocurre específicamente en los enlaces α -cetósidos, típicamente en configuraciones α 2,3 y α 2,6, que son características de los receptores celulares humanos (Cabezas, 2022).

La actividad de esta enzima es esencial para la liberación eficiente de los viriones al final del ciclo de replicación, ya que evita su reencuentro con receptores celulares, lo cual

interferiría con la diseminación viral. Además, la NA contribuye a la penetración del moco respiratorio, al eliminar residuos de ácido siálico que podrían actuar como trampas no productivas (Świerczyńska et al., 2022).

Dado que su actividad enzimática depende estrechamente de su conformación tridimensional, resulta fundamental analizar la organización estructural de la neuraminidasa y los mecanismos bioquímicos que subyacen a su función catalítica.

2.1. Estructura y función bioquímica de la neuraminidasa

2.1.1. Organización estructural del tetramero

La neuraminidasa del virus de influenza A(H3N2) es una proteína de membrana integral tipo II, que forma un homotetramero funcional mediante la asociación no covalente de cuatro subunidades estructuralmente idénticas. Cada protómero está constituido por aproximadamente 470 aminoácidos, organizados en cuatro regiones secuenciales: un dominio citoplasmático N-terminal (residuos 1–6), un segmento transmembrana hidrofóbico (residuos 7–36), una región de tallo (residuos 37–79), y una cabeza catalítica globular (residuos 80–454), donde se localiza el sitio activo de la enzima (figura 10) (Jiang et al., 2023).

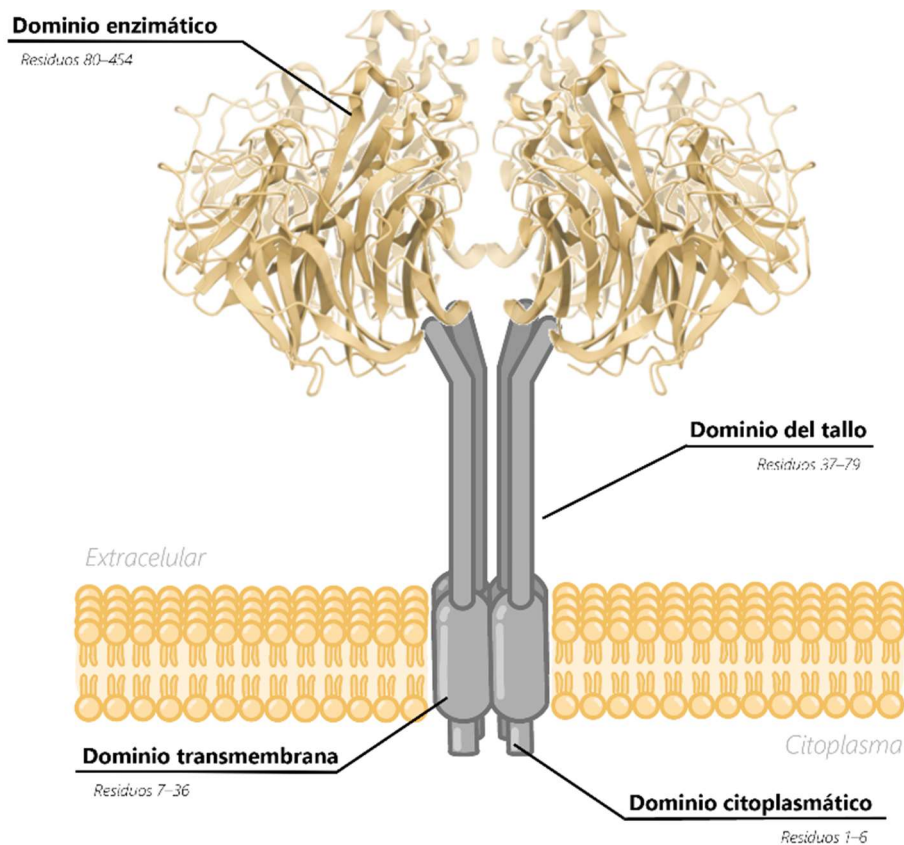


Figura 10. Estructura de la neuraminidasa. La NA es una proteína de membrana homotetramérica que consta de un dominio de cabeza (PDB 7U4G), un dominio de tallo, un dominio transmembrana y una cola citoplasmática. Obtenido y modificado de (Creytens et al., 2021)

La cabeza catalítica C-terminal presenta un plegamiento tipo β -propeller de seis hojas (figura 11), estabilizado por enlaces disulfuro e incorporando sitios de glicosilación conservados, esenciales para su función y estructura. Este dominio está sostenido por el tallo, el cual exhibe una alta variabilidad de secuencia entre cepas, y se encuentra anclado a la membrana del virión a través de una región transmembrana anfipática (Ellis et al., 2022).

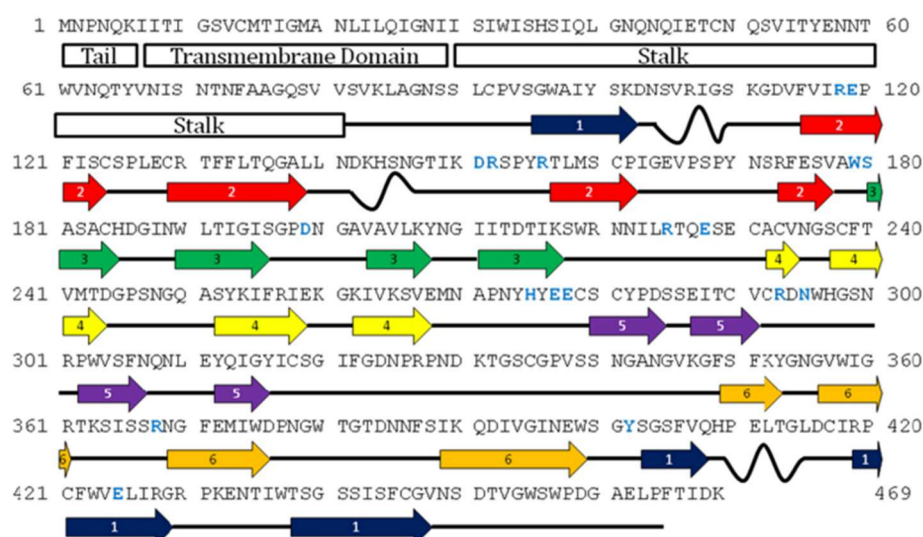


Figura 11. Secuencia de los aminoácidos de la proteína neuraminidasa del virus de la influenza. Se muestrala región que forma la cola citoplasmática, el dominio transmembrana, el tallo y la cabeza globular. Las seis láminas β antiparalelas de 4 hebras, dispuestas como las palas de una hélice, están marcadas y coloreadas en magenta, rojo, verde, amarillo, azul y naranja. Los sitios de unión a fármacos están resaltados y coloreados en azul. Obtenido de (Jagadesh et al., 2016).

2.1.2. Estructura y función del sitio activo

El sitio activo de la neuraminidasa ha sido caracterizado estructuralmente mediante estudios de co-cristalización con análogos del ácido siálico, lo que ha permitido definir con precisión los residuos involucrados en la catálisis. Cada uno de los cuatro protómeros del tetrámero posee un sitio catalítico funcional, ubicado en una cavidad profunda con carga negativa, la cual favorece la unión del sustrato (Świerczyńska et al., 2022) (figura 12). Esta cavidad está delimitada por residuos de aminoácidos altamente conservados, algunos de los cuales se unen directamente al sustrato y participan en la reacción catalítica, mientras que otros cumplen funciones estructurales, contribuyendo a la estabilidad y arquitectura tridimensional del sitio activo (Gubareva & Mohan, 2022).

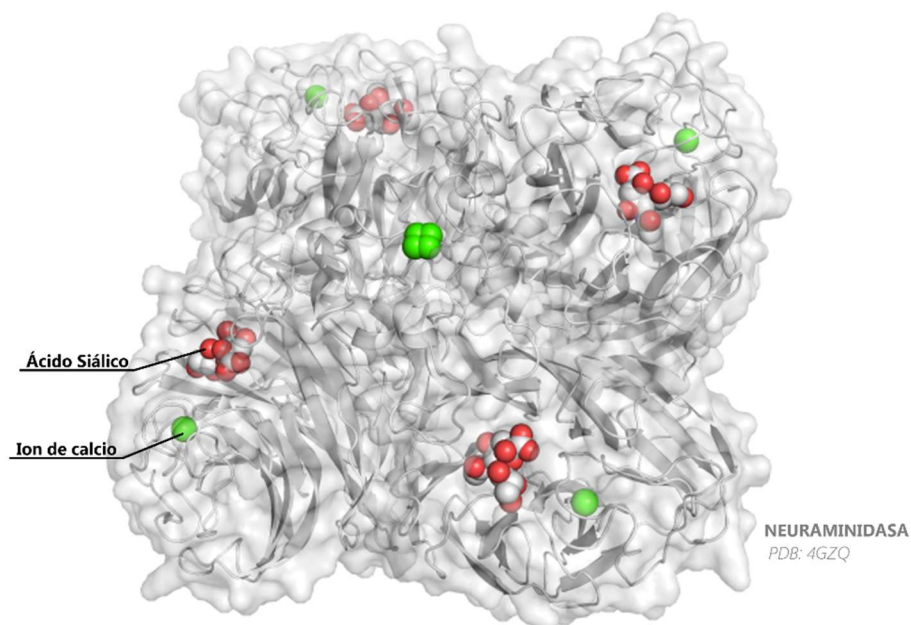


Figura 12. Vista superior del dominio catalítico de la neuraminidasa. El dominio catalítico de la neuraminidasa se divide en cuatro subunidades denominados monómeros, cada uno de ellos posee un sitio catalítico funcional y dos sitios de unión para iones de calcio (PDB: 4GZQ). Visualización generada en PyMOL.

Los residuos R118, D151, R152, R224, E276, R292, R371 e Y406 se consideran catalíticos (o funcionales), mientras que E119, R156, W178, S179, D198, I222, E227, N294 y E425 conforman el marco estructural del sitio activo. En todo el texto se utiliza la numeración correspondiente a la neuraminidasa del subtipo N2 (Gubareva & Mohan, 2022).

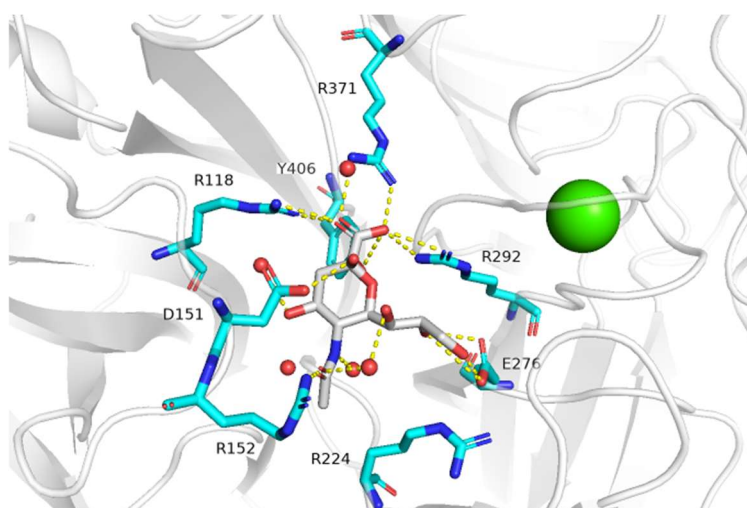


Figura 13. Ácido siálico unido al sitio activo de la Neuraminidasa N2 (PDB:4GZQ). Se observa el sitio activo conformado por los residuos R118, D151, R152, R224, E276, R292, R371 e Y406 (cian), el ion de Ca^{2+} (verde) y las moléculas de agua (rojo). Visualización generada en PyMOL.

La neuraminidasa contiene varios sitios de unión para iones calcio (Ca^{2+}), uno de los cuales está altamente conservado y se localiza en la periferia del bolsillo catalítico de cada protómero (figura 13). Se ha demostrado que estos iones contribuyen a la estabilidad estructural y favorecen la actividad enzimática, y han sido observados con distintos grados de resolución en las estructuras cristalinas. Estudios recientes también han sugerido que la coordinación del Ca^{2+} está relacionada con la flexibilidad conformacional del dominio catalítico, lo que podría tener implicaciones funcionales (Ellis et al., 2022).

2.1.3. Inhibición con Zanamivir

El zanamivir (4-guanidino-Neu5Ac2en) está estructuralmente basado en la molécula DANA (ácido 2,3-deshidro-2-desoxi-N-acetilneuramínico), de la cual se diferencia por la sustitución de un grupo hidroxilo en la posición C-4 por un grupo guanidinio cargado positivamente (Gubareva & Mohan, 2022).

Zanamivir imita el estado de transición de la reacción de hidrólisis catalizada por la neuraminidasa. Su mecanismo de acción implica la formación de enlaces de hidrógeno fuertes entre el grupo carboxilo del ligando y los residuos Arg118, Arg292 y Arg371 (Świerczyńska et al., 2022). Además, se ha observado que el grupo guanidinio establece interacciones con los residuos Asp151 y Glu227 (figura 14) (Taylor & Russell, 2010). Estas interacciones permiten que el zanamivir bloquee eficazmente el sitio activo de la enzima mediante un acoplamiento altamente favorable desde el punto de vista energético (Świerczyńska et al., 2022).

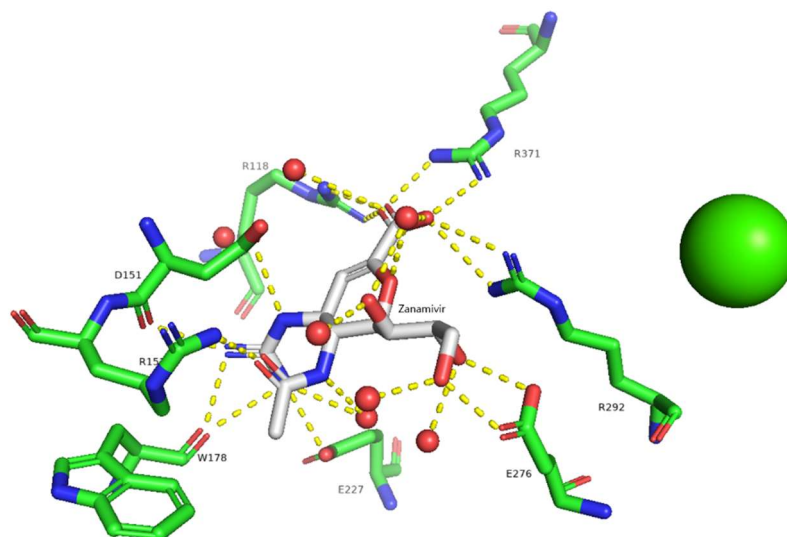


Figura 14. Representación del complejo entre zanamivir y el sitio activo de la neuraminidasa (PDB:4U7G) se muestran las interacciones de tipo enlace de hidrógeno (líneas punteadas amarillas) entre el grupo carboxilo y la tríada de argininas (Arg118, Arg292, Arg371), así como las interacciones adicionales del grupo guanidinio con los residuos Asp151 y Glu227. También se observan residuos

cercanos relevantes como Glu276 y Trp178, moléculas de agua (esferas rojas) y un ion cloruro (esfera verde). Visualización generada en PyMOL.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En 2022, en el Centro de Investigaciones Regionales “Dr. Hideyo Noguchi” de la Universidad Autónoma de Yucatán, se identificaron once cepas del virus de influenza A(H3N2) que presentaron valores atípicos de inhibición enzimática ($IC_{50} \geq 10$ veces superiores al valor del control sensible) frente al antiviral zanamivir. Estas observaciones se obtuvieron en el marco de un estudio de monitoreo funcional, mediante ensayos de inhibición de la neuraminidasa utilizando sustratos fluorogénico (MUNANA) y quimioluminiscente (NA-STAR), en combinación con los antivirales zanamivir y oseltamivir.

Las muestras fueron recolectadas durante la temporada de influenza estacional 2022 en México y corresponden a casos clínicos confirmados provenientes de trece estados de diversas regiones del país, incluidos Nuevo León, Durango, Jalisco, Zacatecas, Sonora, Querétaro, Ciudad de México, Chihuahua, Aguascalientes, Hidalgo, Baja California y San Luis Potosí. Los resultados obtenidos sugieren la posible presencia de mutaciones en el gen de la neuraminidasa que podrían estar afectando su interacción con zanamivir, lo cual justifica la necesidad de una caracterización molecular más detallada de estas cepas (Franco-May et al., 2024).

Ante este hallazgo, surge la siguiente pregunta de investigación: ¿Qué mutaciones en la neuraminidasa de las cepas mexicanas de influenza A(H3N2) están asociadas con la disminución de la sensibilidad a zanamivir, y cómo afectan estas alteraciones estructurales la interacción fármaco-enzima, en términos de estabilidad conformacional y afinidad molecular?

La influenza representa un desafío global debido a su alta capacidad de mutación y evolución antigénica. El subtipo A(H3N2), en particular, ha sido responsable de brotes pandémicos con elevada morbilidad y mortalidad (Lee et al., 2023), así como de una rápida acumulación de mutaciones que afectan la eficacia vacunal. Según la Organización Mundial de la Salud, este virus causa entre 290,000 y 650,000 muertes anuales, siendo México uno de los países afectados por su circulación persistente. Durante la temporada 2021–2022, el 90.7 % de los casos confirmados en el país correspondieron a A(H3N2) (Santos, 2023), con una notable ausencia de la cepa vacunal A/Hong Kong/2671/2019 y la emergencia de variantes como A(H3N2)/Darwin, asociada a un brote atípico en Brasil (Nott et al., 2022). Este desfase antigénico subraya la importancia de los antivirales como segunda línea de defensa.

En este contexto, la neuraminidasa es una diana terapéutica crítica. Inhibidores como zanamivir bloquean su actividad enzimática, esencial para la liberación de nuevos viriones (Xu et al., 2024). Sin embargo, mutaciones en la NA, ya sea directamente en el sitio activo o en regiones estructuralmente relevantes que afectan su conformación, pueden reducir la afinidad por el

fármaco y comprometer su eficacia. Aunque mutaciones clásicas de resistencia (ej. E119V, R292K) están bien documentadas, las cepas mexicanas de 2022 podrían presentar alteraciones no descritas previamente, dado su perfil atípico de inhibición.

Esta investigación busca caracterizar dichas mutaciones mediante un enfoque multidisciplinario que combine bioinformática estructural (modelado por homología, acoplamiento molecular) y dinámica computacional (simulaciones de interacción NA-zanamivir). Los hallazgos permitirán: identificar mutaciones asociadas a la reducción de sensibilidad a zanamivir, evaluar su impacto en la estructura y función de la NA, y fortalecer la vigilancia genómica de cepas resistentes en México.

Los resultados aportarán evidencia científica para optimizar estrategias terapéuticas y políticas de salud pública, anticipando posibles fallos en el tratamiento, diseñando contramedidas frente a cepas emergentes y contribuyendo a bases de datos internacionales sobre resistencia antiviral.

HIPÓTESIS

Las cepas mexicanas del virus de influenza A(H3N2) aisladas durante la temporada 2022 presentan mutaciones en la neuraminidasa que alteran la conformación del sitio activo o regiones adyacentes, lo cual disminuye la afinidad del antiviral zanamivir por la enzima, reduciendo su eficacia inhibitoria.

JUSTIFICACIÓN

La influenza A subtipo H3N2 representa una amenaza significativa para la salud pública debido a su alta capacidad de mutación, lo que puede comprometer la eficacia de los antivirales actuales. En 2022, se identificaron once cepas de este subtipo con valores atípicos de IC_{50} para el antiviral zanamivir en ensayos de inhibición de la neuraminidasa utilizando los sustratos fluorogénicos NA-STAR y MUNANA. Estos hallazgos sugieren la posible presencia de mutaciones en el dominio globular de la neuraminidasa que disminuyen la afinidad del antiviral por su sitio de unión, reduciendo así su eficacia. Dado que la neuraminidasa es esencial para la liberación de nuevos viriones y la propagación del virus, la presencia de variantes resistentes podría limitar las opciones terapéuticas disponibles y facilitar la transmisión del virus, especialmente en poblaciones vulnerables como niños y pacientes inmunocomprometidos. Por lo tanto, es imperativo identificar y analizar las mutaciones presentes en las cepas locales del virus de influenza A(H3N2) que podrían conferir resistencia a zanamivir, con el fin de informar estrategias terapéuticas y de vigilancia más efectivas.

OBJETIVO GENERAL

Describir el efecto de mutaciones en la neuraminidasa de virus influenza A(H3N2) circulantes en México en 2022 sobre su actividad enzimática y su interacción molecular con el antiviral zanamivir.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Identificar posibles mutaciones en el gen de la neuraminidasa de aislamientos de influenza A(H3N2) mediante el diseño in silico de oligonucleótidos específicos, la amplificación por RT-PCR y secuenciación Sanger.

Analizar la diversidad genética y los linajes de circulación de los virus *Influenza A(H3N2)* secuenciados en México durante 2022 mediante la inferencia filogenética.

Identificar in silico la interacción entre la neuraminidasa de cepas de *Influenza A(H3N2)* circulantes en México durante 2022 y el inhibidor zanamivir mediante técnicas de docking molecular.

CAPÍTULO II

METODOLOGÍA

La presente investigación se desarrolló en tres etapas, esquematizadas en la figura 15. En la Etapa I, correspondiente al primer objetivo específico, se diseñaron y sintetizaron tres oligonucleótidos específicos. En la Etapa II se secuenció el gen de la neuraminidasa empleando los oligonucleótidos diseñados. Finalmente, en la Etapa III se identificaron las mutaciones del gen NA, se construyó un árbol filogenético y se generó el modelo tridimensional de la enzima con la mutación de interés. Posteriormente, se realizó un acoplamiento molecular para evaluar la interacción de la proteína con el antiviral zanamivir.

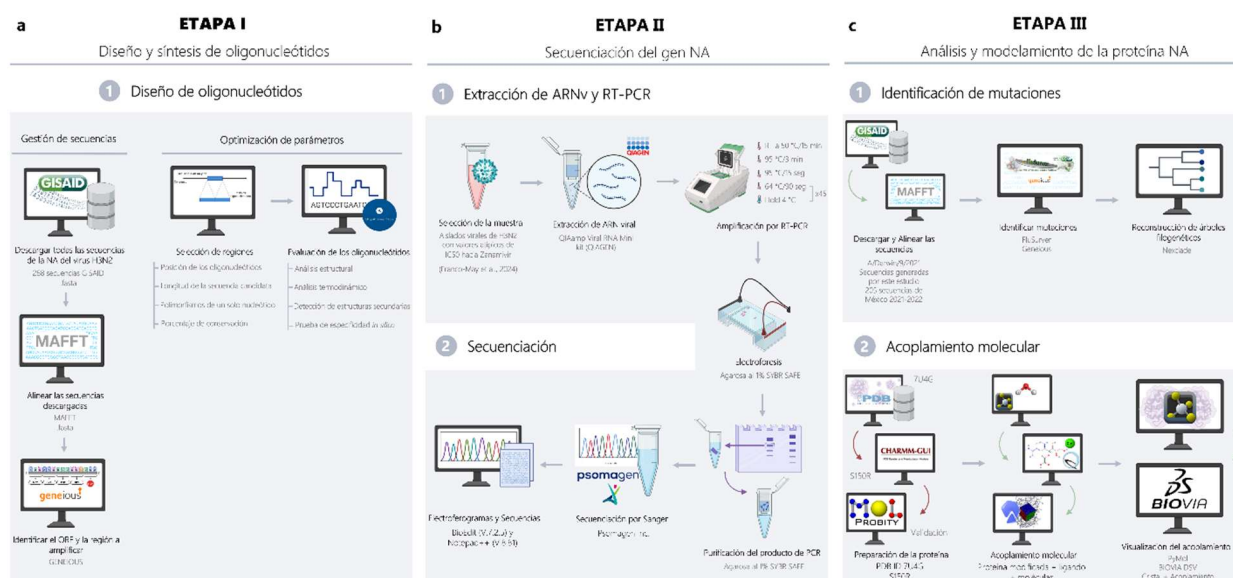


Figura 15. Etapas metodológicas del estudio. (a) Diseño y síntesis de oligonucleótidos. (b) Secuenciación del gen NA. (c) Análisis y modelamiento de la proteína NA.

Etapa I: Diseño *in silico* de oligonucleótidos específicos para el gen NA

El diseño *in silico* de los oligonucleótidos se llevó a cabo en dos fases: (1) gestión de secuencias y (2) optimización de parámetros de especificidad y eficiencia. El objetivo fue desarrollar cebadores dirigidos al dominio globular de la neuraminidasa del virus de influenza A subtipo A(H3N2), capaces de amplificar un fragmento de 1,143 pb. Siguiendo las metodologías descritas por Hendling y Barišić (2019) y por Díaz y Morales (2021), se diseñaron tres oligonucleótidos: dos *forward* (Fw1 y Fw2) y uno *reverse* (Rv1), seleccionados estratégicamente para abarcar regiones conservadas y optimizar la superposición de lecturas, garantizando así una cobertura completa y precisa del fragmento diana.

En la primera fase, se descargaron 268 secuencias en formato FASTA correspondientes al segmento de neuraminidasa del virus de influenza A (subtipo H3N2), de aislamientos mexicanos obtenidos entre 2003 y 2023 y disponibles en la base de datos GISAID.

El alineamiento múltiple se realizó en la versión web de MAFFT (v7), empleando el algoritmo FFT-NS-2 con los siguientes parámetros: matriz de sustitución 200PAM/k=2, penalización por apertura de brecha (gap opening) de 1.53 y desplazamiento (offset) de 0.0. Este procedimiento generó un archivo en formato FASTA con las secuencias alineadas.

Posteriormente, las secuencias alineadas fueron visualizadas y analizadas en Geneious (v2024.0.5), donde se obtuvo una secuencia consenso y se tradujeron todas las secuencias a proteínas, iniciando la traducción en el marco de lectura abierto (ORF) correspondiente.

En la segunda fase se identificó la región a amplificar y se seleccionaron las secuencias de oligonucleótidos a partir de zonas conservadas de la secuencia consenso. Estas se evaluaron en OligoAnalyzer™ mediante análisis termodinámico, detección de estructuras secundarias y validación de especificidad, utilizando los parámetros: ensayo qPCR (predeterminado), ADN como ácido nucleico, concentración de oligonucleótidos 0.2 μ M, Na⁺ 50 mM, Mg²⁺ 3 mM y dNTPs 0.8 mM. Asimismo, se aplicaron los siguientes criterios: contenido de GC $\geq$ 50%, temperatura de fusión (T_m) entre 55–60 °C con una diferencia máxima de 2 °C entre pares, estabilidad de dímeros (homodímeros y heterodímeros) con $\Delta G > -9$ kcal/mol (según IDT) y estructuras de horquilla con T_m inferior a la temperatura operativa del oligonucleótido. La especificidad in silico se verificó mediante BLASTN (NCBI), introduciendo individualmente las secuencias FASTA de los oligonucleótidos contra bases de datos estandarizadas. El algoritmo se configuró para detectar secuencias altamente similares (límite: 5,000 secuencias), considerándose como válidas aquellas alineaciones con identidad $\geq$ 80%. Finalmente, tras confirmar la especificidad in silico, los oligonucleótidos validados se enviaron a T4 OLIGO para su síntesis.

Etapas II: Secuenciación del gen NA

Extracción de ARN viral

Se analizaron 15 aislamientos virales correspondientes al año 2022, enviados por el Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (INDRE) y provenientes de 12 estados de la República Mexicana. Estas muestras fueron seleccionadas debido a que se habían reportado con valores atípicos de IC₅₀ hacia el antiviral Zanamivir en ensayos fenotípicos (Tabla) (Franco-May et al., 2024).

Tabla 2.

Valores de IC₅₀ obtenidos en ensayos de inhibición de la neuraminidasa con zanamivir y oseltamivir en aislamientos de influenza A(H3N2) de México, 2022. Valores atípicos de IC₅₀ respecto a los controles sensibles.

No. de muestra	Estado	Zanamivir (IC ₅₀)		Oseltamivir (IC ₅₀)	
		MUNANA	NA-STAR	MUNANA	NA-STAR
10557	Dgo	34.2179	0.398166	0.00336869	0.278514
10603	Nl	90.2997	10.5053	4.50999	0.15165
11079	Jal	852.814	66.4787	0.0901894	0.302007
11130	Zac	15.82	22.3953	2.99505	3.22065
11152	Son	3.56E-07	49.0043	ND	1.26463
11325	Qro	$\frac{185.032}{0.563588}$	19.2533	0.0453795	$\frac{79.4553}{0.239829}$
11573	CDMX	$\frac{15.97}{19.927}$	36.9831	3.34129	1.85741
11692	Chih	$\frac{32.6631}{2.11914}$	11.3899	15.4908	0.793739
11708	Chih	54.81	0.00186588	55.2394	1.20042
		16.7134	7.90231	19.9584	
11774	Jal	290.716	0.000735313	7.27035	0.613535
		55.73	62.9335	ND	ND
11948	Ags	$\frac{28.77}{16.8371}$	38.0696	5.76873	0.437289
12041	Hgo	$\frac{18.77}{6.14563}$	35.7361	3.26729	0.916284
12347	Bc	40.6317	85.4532	4.02594	0.535082
		66.26	1.31E+07		
12363	Slp	$\frac{21.65}{2.01E+09}$	40.6226	2.46364	1.26227
11171	Hgo	133.353	3.64273	17.4641	0.17233

*ND: No determinado

La extracción del ARN viral se realizó utilizando el kit QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN), siguiendo el protocolo estandarizado del fabricante.

Brevemente, en un tubo de 1.5 mL se añadieron 560 µL de amortiguador AVL con acarreador de ARN, seguido de 140 µL de muestra. La mezcla se homogeneizó durante 15 segundos y se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos. Posteriormente, se agregaron

560 μ L de etanol al 100 %, se mezcló nuevamente durante 15 segundos, y se cargaron 630 μ L de la mezcla en una columna QIAamp Mini. La columna se centrifugó a $8000 \times g$ durante 1 minuto. A continuación, se realizaron lavados con un volumen de 500 μ L del amortiguador AW1, seguido de una centrifugación a $8000 \times g$ durante 1 minuto. Posteriormente, se añadió 500 μ L del amortiguador AW2, centrifugando a $14,000 \times g$ durante 3 minutos.

Para eliminar residuos de etanol, se realizó una centrifugación adicional a $14,000 \times g$ por 1 minuto. Finalmente, la columna se transfirió a un tubo limpio de 1.5 mL, donde el ARN fue eluido con 60 μ L de amortiguador AVE, incubado durante 1 minuto a temperatura ambiente y centrifugado a $8000 \times g$ durante 1 minuto.

El ARN extraído fue almacenado a -70°C hasta su posterior análisis.

Amplificación por RT-PCR

La amplificación del ARN viral se llevó a cabo mediante RT-PCR en un solo paso, utilizando el reactivo PrimeTime® One-Step RT-qPCR Master Mix (Integrated DNA Technologies), conforme a las instrucciones del fabricante. Las reacciones fueron realizadas en un termociclador C1000 Touch Thermal Cycler (Bio-Rad). Cada reacción se preparó con un volumen final de 25 μ L, distribuidos de la siguiente manera: 10 μ L de Master Mix, 1 μ L del oligonucleótido reverso, 1 μ L del oligonucleótido directo (Fw1 o Fw2), según el fragmento a amplificar, y 8 μ L de ARNv. Los oligonucleótidos se emplearon a una concentración de trabajo de 10 μ M. El protocolo de amplificación consistió de un ciclo de transcripción reversa a 50°C durante 15 minutos, seguido de una activación enzimática a 95°C durante 3 minutos. La etapa de amplificación constó de 45 ciclos de desnaturalización a 95°C durante 15 segundos, seguido de alineamiento y extensión a 64°C durante 1 minuto con 30 segundos. Por último se hizo un gel de agarosa al 1% para la visualización del producto de PCR.

Purificación del producto de PCR

La purificación del producto de PCR de 1143pb, se realizó utilizando el QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN), siguiendo las indicaciones del fabricante. Inicialmente, se extrajo cuidadosamente de un gel de agarosa el fragmento que contenía el ADN de interés, eliminando el exceso de gel para conservar únicamente la banda correspondiente.

El fragmento de gel fue transferido a un tubo Eppendorf de 1.5 mL, al cual se añadieron tres volúmenes de Buffer QG por cada volumen de gel, incubando la mezcla a 50°C durante 10 minutos, hasta lograr la completa disolución del gel. La solución resultante presentó un color amarillo, lo que indicó un pH óptimo para la unión del ADN a la membrana de la columna.

A continuación, se agregó un volumen de isopropanol al 100 % equivalente al volumen del gel disuelto, para favorecer la precipitación del ADN. La mezcla se aplicó sobre una columna QIAquick, cargando hasta 800 µL por vez y centrifugando a 13,000 rpm durante 1 minuto. Este paso se repitió hasta transferir el total de la muestra.

Para eliminar residuos de agarosa, se lavó la columna con 500 µL de Buffer QG, seguido de una centrifugación a 13,000 rpm durante 1 minuto. Posteriormente, se realizó un lavado adicional con 750 µL de Buffer PE (previamente suplementado con etanol al 96–100 %) y se centrifugó nuevamente bajo las mismas condiciones; este paso se repitió una segunda vez para asegurar la eliminación de impurezas. Finalmente, el ADN purificado se eluyó añadiendo 50 µL de agua libre de nucleasas directamente sobre la membrana, incubando durante 1 minuto a temperatura ambiente, seguido de una centrifugación a 13,000 rpm durante 1 minuto. El ADN purificado se almacenó a -20 °C hasta su uso posterior.

Secuenciación

Las muestras de ADN purificado fueron enviadas a la empresa Psomagen Inc. para secuenciar por el método de Sanger. El resultado de las secuencias y electroferogramas, se descargaron del sitio web de Psomagen en formato FASTA y ab1, y se visualizaron en Notepad++ (V.8.81) y BioEdit (V.7.2.5) respectivamente.

Etapas III: Análisis y modelamiento de la proteína NA

Identificación de mutaciones

Los archivos FASTA se alinearon con la cepa de referencia A/Darwin/9/2021, utilizando la versión web de MAFFT (v7), empleando el algoritmo FFT-NS-2 con los siguientes parámetros: matriz de puntuación 200PAM/k=2, penalización por *gap opening* = 1.53 y desplazamiento (*offset*) de 0.0. Posteriormente, se identificaron las sustituciones de aminoácidos presentes en la neuraminidasa, respecto a la cepa vacunal y aislamientos virales reportados en México y a nivel global mediante la plataforma FluSurver. Posteriormente, se descargaron de la base de datos GISAID 205 secuencias del segmento de neuraminidasa del virus de influenza A (subtipo H3N2), correspondientes a aislamientos mexicanos reportados entre 2021 y 2022. Estas secuencias se alinearon con la cepa vacunal y con las generadas en este estudio, y las mutaciones resultantes se visualizaron en Geneious.

Así mismo, se generó el árbol filogenético por máxima verosimilitud utilizando los parámetros GTR+I+G (General Time Reverse con proporción de sitios invariantes y distribución Gamma de tasas) ampliamente utilizado en estudios de sistemática molecular (Nguyen et al., 2015). El árbol se generó utilizando el software Nextstrain.

Docking Molecular

Preparación de la proteína

Para el *docking* molecular, se consultó la base de datos Protein Data Bank (PDB). Se verificó que la estructura seleccionada incluyera la presencia del cofactor Ca^{2+} , del ligando zanamivir y de las moléculas de agua cristalográficas, con el fin de preservar la conformación del sitio activo y las interacciones relevantes. Adicionalmente, se revisaron los reportes del PDB Validation para evaluar parámetros como *Percentile Ranks*, *Rfree*, *clashscore* y *Ramachandran outliers*, así como la calidad estructural del ligando. La calidad del cristal se validó posteriormente con MolProbity (v4.5.2) para confirmar que cumplía con los estándares requeridos para el estudio.

Posteriormente, se analizó la secuencia de aminoácidos del cristal y se comparó con las secuencias generadas en este estudio. Se incorporaron únicamente las mutaciones identificadas en el sitio activo o en regiones adyacentes con potencial influencia en la interacción con zanamivir. Se empleó la herramienta CHARMM-GUI para sustituir los residuos correspondientes, generando un archivo PDB del cristal modificado llamado “7U4G_150.pdb”. Este archivo fue nuevamente evaluado en MolProbity para confirmar su idoneidad en el acoplamiento molecular.

Acoplamiento molecular

El acoplamiento molecular se realizó empleando como receptor la estructura de la neuraminidasa del virus de influenza A(H3N2) previamente optimizada en CHARMM-GUI, mientras que el ligando (zanamivir), las moléculas de agua intrínsecas y el cofactor Ca^{2+} fueron obtenidos de la estructura cristalográfica depositada en el Protein Data Bank (PDB ID: 7U4G). Todo el procedimiento se llevó a cabo en un entorno Linux Mint.

En primer lugar, se analizó la estructura cristalográfica para identificar las moléculas de agua intrínsecas que participan en interacciones con el ligando (zanamivir) y residuos de la proteína. En PyMOL, se seleccionaron las moléculas de agua de interés (HOH 623), y se adicionaron hidrógenos a las moléculas seleccionadas, el archivo se guardó como 1W.pdb.

El ligando zanamivir se aisló en UCSF Chimera (v1.17.3) eliminando las demás moléculas de la estructura cristalográfica y exportándose en formato mol2 con el nombre ZMR.mol2. Siguiendo el mismo procedimiento para el cofactor Ca^{2+} , el cual se guardó como archivo pdb con el nombre “Ca.pdb”.

Una vez aislados los componentes de interés, se reconstruyó el receptor mediante la apertura simultánea de los archivos de la proteína (“7U4G_150.pdb”), la molécula de agua (“1W.pdb”) y el cofactor (“Ca.pdb”) en PyMOL, generando un nuevo sistema que se guardó con el nombre “7U4G_1W_CA.pdb”.

Posteriormente, el archivo del receptor se abrió en AutoDock Tools (ADT), donde se adicionaron las cargas parciales de Kollman y se incorporaron hidrógenos polares. El receptor preparado se guardó en formato pdbqt. El ligando (zanamivir) se preparó en el mismo entorno, adicionando cargas de Gasteiger y guardando el archivo resultante también en formato pdbqt.

La caja de acoplamiento se centró en la posición del ligando con coordenadas $x = 24.064$, $y = -7.8$, $z = 14.825$, con dimensiones de $40 \times 40 \times 40$ Å y un espacio entre puntos de 0.375 Å, asegurando la inclusión de los residuos del sitio activo. Los parámetros de configuración se almacenaron en el archivo Config.txt.

Finalmente, el acoplamiento molecular se llevó a cabo en AutoDock Vina. Para ello, desde la terminal de Linux se ejecutó el programa con el comando “vina --config Config.txt”, obteniéndose las conformaciones y energías de unión del ligando en el sitio activo de la neuraminidasa en un archivo nombrado “Docking_vina.pdbqt”.

Con el fin de validar el protocolo de acoplamiento molecular, se llevó a cabo un análisis de redocking, para ello, los conformeros obtenidos en AutoDock Vina fueron desagrupados a partir del archivo Docking_vina.pdbqt mediante el comando `vina_split --input Docking_vina.pdbqt --ligand conformero_`, generándose así los archivos individuales correspondientes a cada una de las nueve conformaciones calculadas.

El conformero con mayor afinidad se exportó en formato MOL2 utilizando PyMOL (archivo “1_conformero.mol2”). Posteriormente, el archivo “ZMR.mol2” que contiene el ligando cristalizado y el “1_conformero.mol2” fueron cargados en VMD, donde se realizó el cálculo del RMSD. Donde, de acuerdo con los criterios aceptados en la literatura, valores de $\text{RMSD} \leq 2.0$ Å se consideran indicativos de una adecuada reproducción de la pose nativa del ligando, mientras que valores ≤ 1.5 Å representan una validación de alta confianza.

Por último la interacción proteína-ligando se visualizó en PyMol y las interacciones se analizaron en el software Discovery Studio Visualizer BIOVIA.

CAPÍTULO III

RESULTADOS

Diseño in silico de oligonucleótidos específicos para el gen NA

La Figura 16 resume esquemáticamente la localización de los oligonucleótidos diseñados en relación con el dominio catalítico de la neuraminidasa, indicando las posiciones en nucleótidos y el solapamiento óptimo para la obtención de lecturas completas mediante secuenciación Sanger.

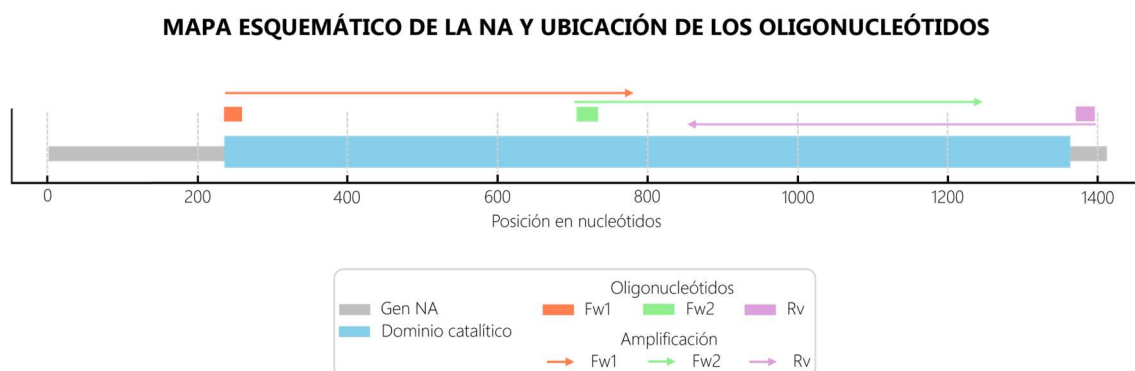


Figura 16. Representación esquemática del gen de neuraminidasa del virus A(H3N2), mostrando el dominio catalítico (en azul), la ubicación de los oligonucleótidos diseñados Fw1 (anaranjado), Fw2 (verde) y Rv1 (morado). Las flechas señalan el fragmento amplificado por cada oligonucleótido.

Cada oligonucleótido fue diseñado considerando parámetros críticos como la longitud, el contenido de GC, la temperatura de fusión (T_m) y la presencia de polimorfismos de nucleótido único (SNPs), con el fin de garantizar la especificidad y robustez bajo las condiciones de PCR. Como se presenta en la Tabla 3, los cebadores mostraron un contenido de GC equilibrado (40,0–52,4%) y una T_m homogénea (62,7–64,9 °C), valores adecuados para reacciones estandarizadas. La longitud de los cebadores se situó entre 21 y 25 pb. Asimismo, se minimizó la presencia de SNPs conocidos en los sitios de unión (<23% para Fw1 y <14% para Rv), lo que disminuye el riesgo de fallos de amplificación en variantes genéticas.

Tabla 3

Características de los cebadores diseñados para PCR

Cebadores	Secuencia (5'-3')	Longitud	SNPs (%)	GC (%)	T_m (°C)
Fw1	GCCCCAAACCAGCAGAATACA	21	23	52.4	64.9
Fw2	GCGTTTGTATCAATGGA ACTTG TAC	25	20	40.0	62.7

Rv	GCCATGAGCCTGTTCCATATGT	22	13.63	50.0	64.7
----	------------------------	----	-------	------	------

El análisis termodinámico mostró que todos los oligonucleótidos presentaron una estabilidad estructural adecuada, con valores de ΔG para hairpins y dímeros dentro de los límites recomendados por IDT. La evaluación de especificidad mediante BLASTN evidenció identidades de secuencia superiores al 85% con cepas de H3N2, lo que respalda su idoneidad para estudios en aislamientos nacionales. Los valores detallados de las propiedades termodinámicas y de especificidad se presentan en la Tabla 5.

Tabla 4

Propiedades termodinámicas y especificidad de los oligonucleótidos diseñados.

Oligo	Estructuras secundarias			Dímeros		
	ΔG (cal·K ⁻¹ ·mol ⁻¹)	ΔH (kcal/mol)	ΔS (cal·K ⁻¹ ·mol ⁻¹)	Homodímero ΔG (kcal/mol)	Heterodímero (ΔG) (kcal/mol)	BLASTN H3N2 (%)
Fw1	-0.04	-18.1	-60.59	-3.14	Fw2: -7.18	94.12
					Rv: -3.55	
	-0.28	-27.6	-91.64			
Fw2	-0.17	-29.2	-97.38			87.2
	0.32	-48.1	-162.39			
	0.41	-26.8	-91.27	-3.9	Rv: -11.36	
	0.54	-12.4	-43.41			
	0.59	-21.2	-73.08			
Rv	-0.38	-14.8	-48.37			90.26
	0.2	-17.6	-59.72	-7.82	-	
	0.31	-26.8	-90.93			

Identificación de mutaciones en el gen NA de aislados virales de H3N2

Se seleccionaron 9 aislados que presentaron valores de IC₅₀ atípicos en los ensayos de inhibición de la neuraminidasa.

Los resultados de la Figura 17 muestran la amplificación de los productos de PCR en las 9 muestras utilizando los primers diseñados.

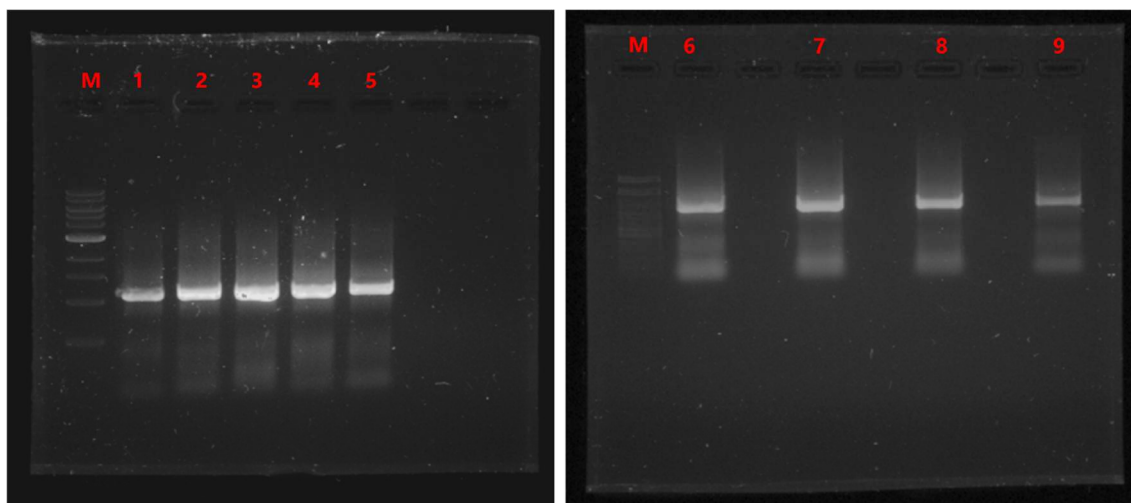


Figura 17. Electroforesis en gel de agarosa del productos amplificado del gen NA del virus de influenza A(H3N2).

De los nueve productos de PCR enviados a secuenciación únicamente de cuatro correspondientes a las muestras 11152, 11708, 11325 y 11774, se obtuvieron secuencias.

El análisis BLASTN reveló que todas las secuencias correspondieron al virus Influenza A(H3N2), con identidades entre 91.22 % y 93.96 % respecto a las secuencias depositadas en la base de datos de NCBI.

Tabla 5.

Cobertura y porcentaje de identidad de las secuencias consenso obtenidas mediante secuenciación Sanger y analizadas por BLASTN

ID de muestra	Cobertura (aa)	Identidad (%)	BLASTN
11152	85–443	92.44	Influenza A(H3N2)
11325	92–443	91.22	Influenza A(H3N2)
11708	93–443	93.96	Influenza A(H3N2)
11774	86–443	91.22	Influenza A(H3N2)

El análisis mediante la plataforma FluSurver identificó varias sustituciones de aminoácidos en las secuencias obtenidas, en comparación con la cepa vacunal A/Darwin/9/2021 (Tabla 9).

Tabla 6.*Tabla de mutaciones detectadas por muestra (comparación con A/Darwin/9/2021)*

ID muestra	Mutaciones detectadas
11152	S150R, T238A, D346G
11325	S150R, T238A, D346G
11708	S150R, T238A, S329N
11774	S150R, T238A, D346G, V287I

El alineamiento múltiple de las secuencias respecto a las 205 secuencias de virus de México de los años 2021–2022 reveló la presencia de una serie de mutaciones incluyendo 4 de las descritas cuando se compararon con la cepa vacunal (Tabla 10).

Cabe señalar, que de todas las mutaciones identificadas, la mutación en la posición 150 con el cambio de Serina a Arginina, se consideró de interés debido a su cercanía con el sitio catalítico de la NA y su interacción con el antiviral zanamivir.

Tabla 7.*Listado de mutaciones de las secuencias mexicanas de NA (2021–2022) con respecto a la cepa vacunal A/DARWIN/9/2021.*

Posición	Aminoácido cepa vacunal	Variantes observadas	Frecuencia del aa de la cepa vacunal (%)
150	S	R (94.63%), H (5.36%)	0.00
238	T	A (28.29%)	71.70
239	N	S (55.60%)	44.40
287	V	I (0.97%)	99.02
346	D	G (31.70%), S (14.63%), N (2.48%), Y (0.48%)	50.73

El análisis filogenético de las secuencias obtenidas se llevó a cabo utilizando la plataforma Nextstrain, lo que permitió ubicar las muestras mexicanas en el contexto global de circulación del virus. De manera general, las secuencias se distribuyeron en dos subclados principales del clado B (figura 18).

entre secuencias virales recolectadas en distintas regiones de México (resaltadas) y la cepa vacunal de referencia A/Darwin/9/2021. Las secuencias 11708_Chihuahua, 11152_Sonora, 11774_Jalisco y 11325_Querétaro se indican en negritas para destacar su ubicación filogenética relativa. Los clados B.2 (en rosa) y B.3 (en amarillo) representan diferentes linajes virales circulantes. La distancia genética entre cepas locales y la cepa vacunal sugiere variabilidad en la posible eficacia de la inmunización regional.

Visualización generada en FigTree.

La muestra 11708_Chihuahua, se agrupó dentro del subclado B.3, en estrecha relación con secuencias de San Luis Potosí y Zacatecas, además de compartir proximidad filogenética con aislamientos internacionales provenientes de Brasil, Bangladesh, India y Etiopía. Esta localización indica que la secuencia de Chihuahua forma parte de un linaje B.3 caracterizado por la circulación simultánea en distintas regiones geográficas, lo cual refleja una posible conexión epidemiológica entre México y otros países.

Por otra parte, las muestras 11152_Sonora, 11774_Jalisco y 11325_Querétaro se localizaron dentro del subclado B.2, agrupándose en un clado monofilético que reúne a la mayoría de las secuencias mexicanas analizadas durante el periodo de estudio. Aunque estas tres muestras no conforman un clúster cerrado entre sí, su ubicación dentro de B.2 sugiere que representan variantes estrechamente relacionadas que circulan de manera predominante en México.

Finalmente, la cepa vacunal de referencia A/Darwin/9/2021 se situó basal al clado B, actuando como punto de referencia filogenético. Sin embargo, no se encontró integrada dentro de los subclados B.2 ni B.3.

Análisis de acoplamiento molecular

El análisis de validación mediante MolProbity indicó que la estructura 7U4G del PDB presenta una geometría global aceptable. Por su parte, la validación de la proteína generada por este estudio mostró que el modelo no presenta *outliers* en el diagrama de Ramachandran (0.0%) y mantiene un porcentaje elevado de residuos en regiones favorecidas (96.13%). Asimismo, la mayoría de los rotámeros se encuentran en conformaciones favorables (96.38%), con solo un 0.66% clasificado como pobre. Aunque se observaron desviaciones locales, como 2.3% de outliers en CaBLAM y 1.56% en geometría de Ca, estas no comprometen de manera significativa la conformación global. En conjunto, la estructura se considera adecuada para estudios de acoplamiento molecular.

Como resultado de la preparación de la estructura de la neuraminidasa 7U4G se identificó y eliminó a la molécula de agua intrínseca HOH 623, la cual establece interacciones con los residuos Glu227 y Glu277, además de presentar un contacto directo con el ligando zanamivir (Figura 18). La distancia promedio de interacción fue de aproximadamente 4 Å, lo que indica una posible contribución en la estabilización del complejo enzima-inhibidor.

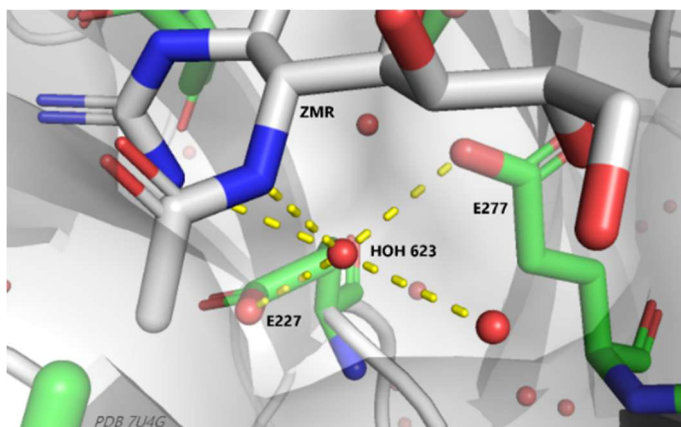


Figura 19. Interacciones de la molécula 7U4G con el zanamivir (ZMR).

Posteriormente, y como resultado de incorporar la sustitución S150R en la estructura de la NA en la molécula 7U4G generando una nueva 7U4G_150, el sistema del receptor obtenido se muestra en la Figura 19, conformado por la neuraminidasa optimizada en CHARMM-GUI con la sustitución R150, el ion Ca^{2+} y la molécula de agua HOH 623. Este conjunto estructural presentó una energía total de -10.935 tras la incorporación de cargas parciales, lo que refleja un estado estable para el proceso de acoplamiento. En cuanto al ligando, el zanamivir mostró una carga total de 0.0001 , resultado de su parametrización electrostática.

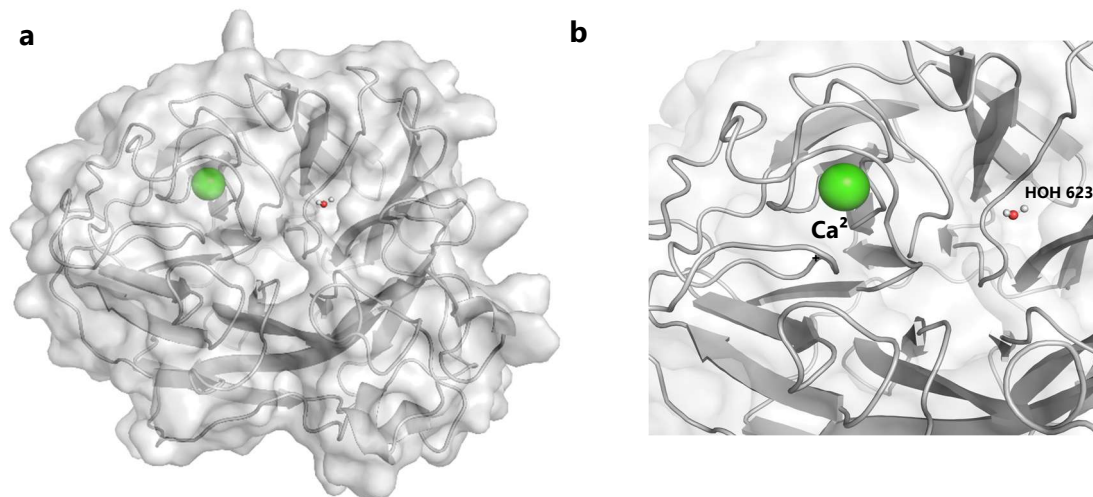


Figura 20. Sistema del receptor. Neuraminidasa 7U4G_150, ion de Ca^{2+} y molécula de HOH 623.

Para confirmar que los residuos catalíticos y estructurales relevantes quedaran incluidos en el espacio de exploración se generó una “caja de acoplamiento” centrada en la posición del ligando cristalográfico y con las coordenadas $x = 24.064$, $y = -7.8$ y $z = 14.825$, dimensiones de $40 \times 40 \times 40 \text{ \AA}$ y un espaciado de $0.375 \text{ \AA}$ (Figura 20). Garantizando así la evaluación adecuada de las posibles conformaciones de unión del inhibidor.

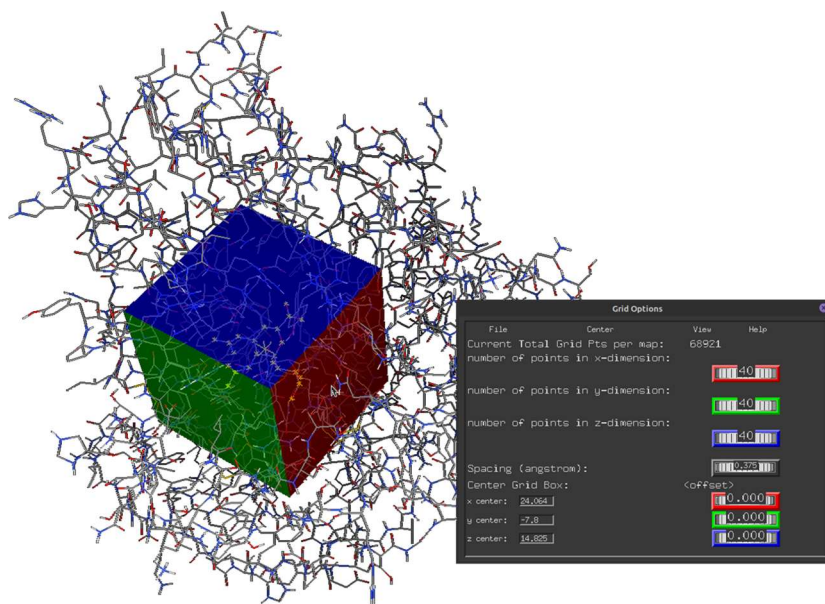


Figura 21. Caja de acoplamiento molecular utilizada en el cálculo de docking. Los colores rojo, verde y azul corresponden a las dimensiones de la caja en los ejes x, y y z, respectivamente

El acoplamiento molecular para la estructura 7U4G_150 realizado en AutoDockVina generó nueve conformaciones del complejo neuraminidasa–zanamivir, con valores de energía de unión entre -7.6 y -6.4 kcal/mol. La Tabla 11 muestra los resultados detallados de afinidad y desviación RMSD.

Tabla 8.

Energías de unión y desviaciones RMSD de las conformaciones generadas por AutoDock Vina para el complejo neuraminidasa–zanamivir.

Conformación	Afinidad (kcal/mol)	RMSD l.b.	RMSD u.b.
1	-7.6	0.000	0.000
2	-7.4	2.820	5.332
3	-7.4	2.327	4.262
4	-7.1	2.916	6.679
5	-6.8	1.812	4.813
6	-6.8	2.638	5.479
7	-6.7	2.722	5.345

8	-6.4	2.821	6.527
9	-6.4	1.860	4.934

El modelo 1 presentó la mayor afinidad (-7.6 kcal/mol) con RMSD de 0.000, siendo considerado como el mejor modelo. En la Figura 22 se ilustran los conformeros generados, donde se aprecia la similitud espacial entre las conformaciones de mayor afinidad y las variaciones estructurales en las de menor estabilidad.

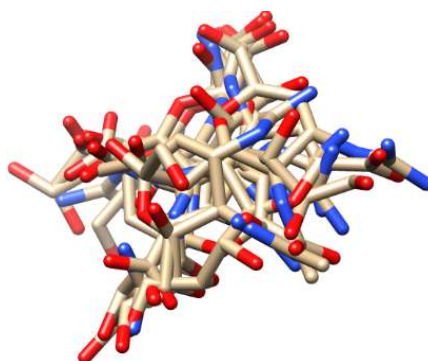


Figura 22. Conformeros del ligando cristalizado ZMR obtenidos en el cálculo de docking con AutoDock Vina.

Con el fin de validar la confiabilidad del protocolo empleado, se realizó un análisis de redocking entre la conformación cristalográfica del zanamivir y la pose de mayor afinidad generada en AutoDock Vina (-7.6 kcal/mol) que mostró un valor de RMSD de 1.24 Å, así como también de la proteína del cristal nativa 7U4G y 7U4G_150. Este resultado con un umbral de 2.0 Å, es considerado como criterio de validación del protocolo, y de un rango de alta confianza (≤ 1.5 Å) (Shamsian et al., 2024). La superposición estructural evidenció una coincidencia adecuada entre ambas conformaciones, confirmando la correcta orientación del inhibidor en el sitio activo de la neuraminidasa (Figura 22).

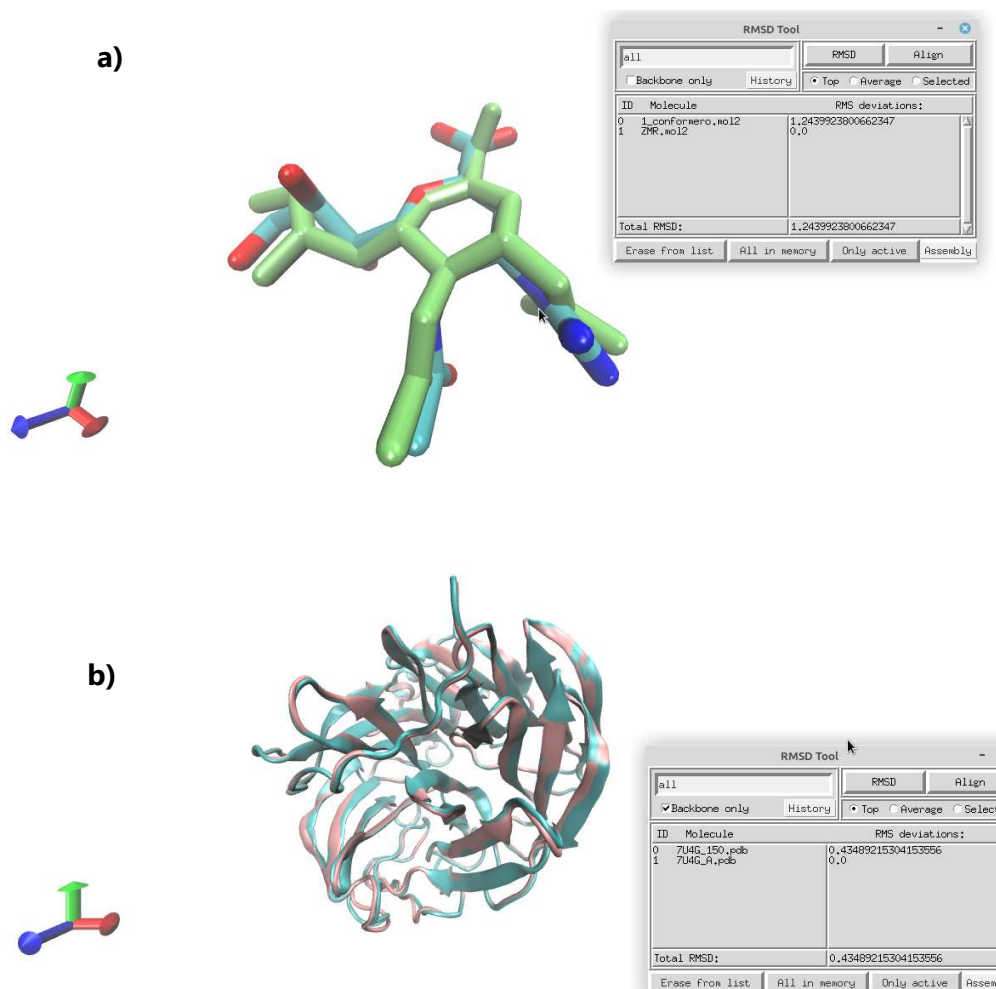


Figura 23. Validación del redocking. a) Superposición entre la conformación cristalográfica del zanamivir (coloración CPK) y la pose predicha de mayor afinidad obtenida en AutoDock Vina (en color verde), con un valor de RMSD de 1.24 Å. b) superposición de la proteína cristalizada 7U4G (rosado) y la proteína generada por este estudio (verde) con valor de RMSD de 0.43 Å. Validación y visualización generada por VMD.

El análisis comparativo entre la estructura cristalográfica de la neuraminidasa y la estructura con el residuo R150 ambas en complejo con zanamivir permitió identificar la red de interacciones características de la unión del inhibidor al bolsillo catalítico para cada una de ellas. En la estructura cristalográfica (Figura 23), el grupo carboxilato del ligando estableció interacciones iónicas con la tríada de argininas Arg118, Arg292 y Arg371, conformando el anclaje electrostático principal del complejo. Asimismo, el grupo guanidinio de zanamivir participó en enlaces de hidrógeno con Glu119 y Glu227, interacciones esenciales para la orientación del inhibidor dentro de la cavidad catalítica.

En la región correspondiente al loop 150, se observaron enlaces de hidrógeno directos con Asp151, complementados por un puente de hidrógeno mediado por una molécula de agua (HOH:623) hacia Arg152, lo que refuerza la estabilidad local del complejo. Adicionalmente, se

identificaron enlaces de hidrógeno con Arg224, Asn294, Tyr406 y His347, los cuales contribuyen a consolidar la red polar.

El entorno hidrofóbico, constituido por residuos como Trp178, Ile222, Leu134, Ala246, Glu276 y Glu277, aportó interacciones de tipo van der Waals que favorecen el ajuste espacial del ligando. En conjunto, la disposición de estas interacciones refleja el modo de unión canónico de zanamivir, caracterizado por la tríada de argininas, la participación de Glu119/Glu227 y la integración del loop 150, confirmando la alta complementariedad entre el inhibidor y el sitio activo de la enzima.

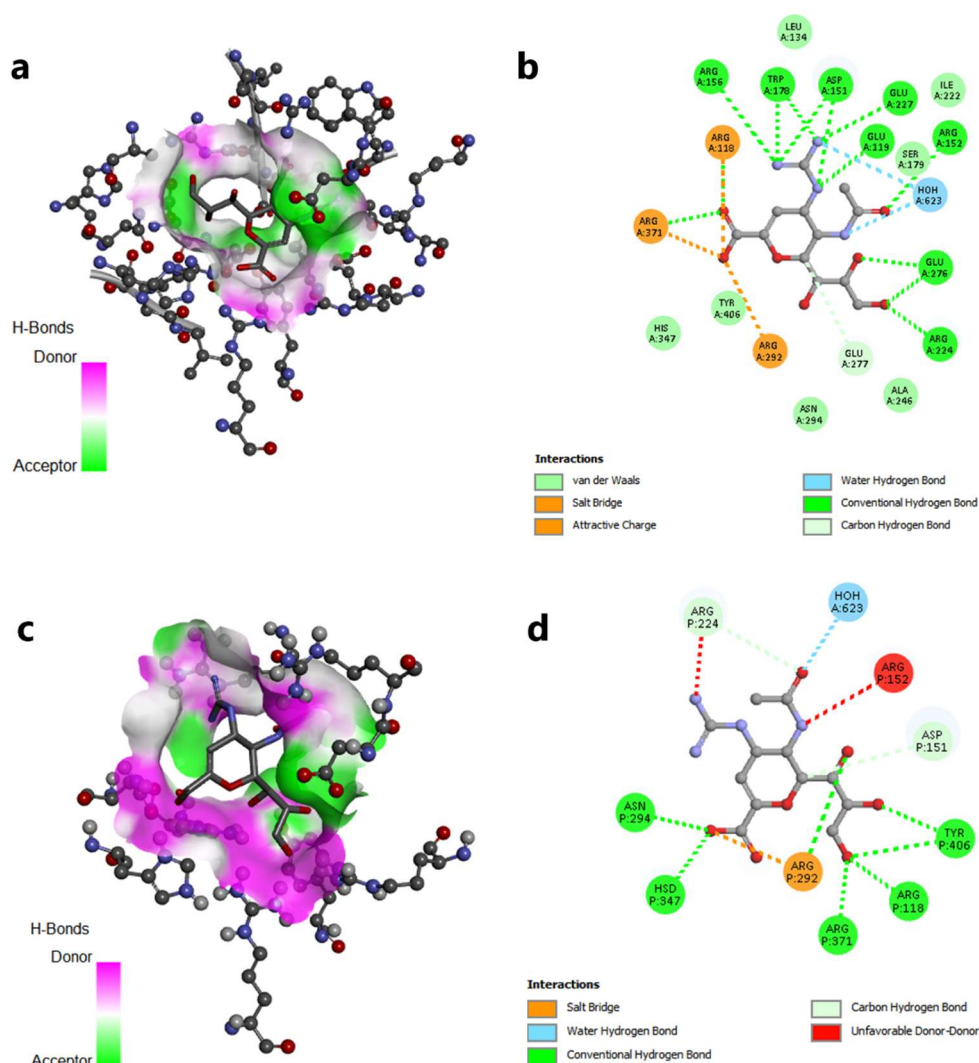


Figura 24. Representación tridimensional (a, c) y bidimensional (b, d) del complejo neuraminidasa–zanamivir del PDB 7U4G (a, b) y la proteína de NA 7U4G_150 (c, d), obtenida en Discovery Studio Visualizer BIOVIA. (a, c) En la representación tridimensional el ligando (zanamivir) se muestra en color gris en el centro de la cavidad catalítica. La superficie de la proteína resalta las regiones aceptoras (verde) y donadoras (magenta) de enlaces de hidrógeno. Se observan residuos clave en la interacción y una molécula de agua intrínseca (HOH:623) participando en la red de enlaces. (b, d) En el mapa

bidimensional los enlaces de hidrógeno convencionales se muestran en verde, los puentes salinos en naranja, y los enlaces mediados por agua en azul.

Por otro lado, en la estructura con el residuo R150 se identificaron enlaces de hidrógeno convencionales con residuos clave de la cavidad catalítica. El ligando estableció puentes de hidrógeno con Asp151, Arg118, Arg224, Arg292, Arg371, Asn294, Tyr406 y His347, con distancias que oscilaron entre 1.9 y 3.1 Å. Asimismo, se observó la formación de sólo un puente salino con Arg292. Se identificó la participación de una molécula de agua intrínseca (HOH:623), que actúa como mediador en el establecimiento de un puente de hidrógeno con el residuo Arg152, contribuyendo a la estabilidad del complejo. Cabe destacar la presencia de contactos desfavorables entre donadores de hidrógeno (zanamivir–Arg152), lo que refleja posibles restricciones estéricas en la orientación del inhibidor dentro del sitio activo.

Los resultados del análisis de acomplamiento molecular indican que un cambio en la estructura de la NA por la mutación S150R, la cuál fue detectada en los virus AH3N2 con valores atípicos de IC50 con el zanamivir, ocasionan inestabilidad en la interacción con el antiviral impidiendo mediciones estables cuando se realizan los ensayos fenotípicos.

DISCUSIÓN

Este trabajo estuvo enfocado en determinar el efecto de mutaciones en la NA de virus de influenza AH3N2 que circularon en México en el período 2022-2023, y que en ensayos fenotípicos para determinar susceptibilidad a los antivirales oseltamivir y zanamivir, mostraron valores atípicos contra el zanamivir sin que estuvieran asociados a mutaciones ya descritas que confieren resistencia al antiviral.

En la primera etapa de este trabajo se logró el diseño *in silico* de tres oligonucleótidos específicos dirigidos al gen de la neuraminidasa (NA) del virus influenza A(H3N2), utilizando un total de 268 secuencias de aislamientos mexicanos recolectados entre 2003 y 2023. La identificación de regiones altamente conservadas dentro del dominio globular permitió seleccionar sitios óptimos para el anclaje de los cebadores, asegurando la cobertura de zonas catalíticas relevantes y un solapamiento adecuado para su posterior secuenciación mediante el método de Sanger. De acuerdo con lo señalado por Hendling y Barišić (2019), la precisión en el manejo de los datos de secuencia y el diseño cuidadoso de cebadores y sondas constituyen factores determinantes para el éxito en las reacciones moleculares, lo cual se corroboró en este estudio con la amplificación de un producto de 1142pb que fue posteriormente corroborado con la secuenciación en 9 de las 15 muestras seleccionadas que fueron reportadas por Franco-May et al (2024) con valores atípicos de IC50 para el antiviral zanamivir.

El análisis de las secuencias obtenidas y el árbol filogenético indentificó que los virus analizados pertenecen a los clados B2 y B3. El hecho de que las secuencias mexicanas se encuentren en subclados derivados y no agrupadas directamente con A/Darwin/9/2021 sugiere la existencia de diferencias genéticas acumuladas. Dichas diferencias podrían tener implicaciones en la eficacia vacunal, particularmente si afectan regiones críticas de la neuraminidasa.

El análisis de las secuencias identificó la presencia de la mutación T238A, cuya relevancia biológica aún no ha sido descrita en la literatura científica disponible. Según los registros de FluSurver, esta mutación ha sido identificada en un número limitado de ocasiones (10 reportes, correspondientes al 0,50% de todas las secuencias NA analizadas), en un solo país, siendo los primeros aislamientos las cepas A/Maryland/9072/2019 y A/Maine/03/2020. Sin embargo, el hallazgo en este estudio adquiere mayor importancia, ya que el 28,29% de las secuencias reportadas en México durante el año 2022 presentaron dicha sustitución. Aunque hasta el momento no se han asociado efectos funcionales específicos al residuo 238 en la neuraminidasa, su frecuencia en aislamientos recientes de la región sugiere que podría tratarse de un cambio emergente.

Por otra parte, la mutación S150R fue la de mayor relevancia en este análisis. En México, el 94,64% de las secuencias depositadas en GISAID para el año 2022 presentaron esta sustitución, lo que evidencia una clara tendencia hacia su fijación en la población viral. En este estudio se observó que la arginina desplazó rápidamente a la serina en dicha posición, un fenómeno comparable a lo descrito por Mögling et al., (2017), quienes reportaron que entre 2005 y 2008 la histidina en la misma posición fue reemplazada rápidamente por arginina, sugiriendo una ventaja adaptativa. Además, estos autores demostraron que la sustitución H150R en la NA de virus A(H3N2) se asoció con la capacidad de aglutinar eritrocitos de pavo y de tipo O humano, contribuyendo a su predominio en las cepas circulantes. En este contexto, la sustitución S150R observada en nuestro análisis podría representar un nuevo evento de sustitución adaptativa que merece evaluaciones funcionales adicionales.

La importancia de la sustitución en la posición 150 radica en que este residuo forma parte del loop 150 (residuos 147–152) de la neuraminidasa, una región estructuralmente flexible que delimita parcialmente la cavidad catalítica y que ha sido reconocida como determinante en la unión de inhibidores como zanamivir (McAuley et al., 2019). El análisis comparativo entre la estructura cristalográfica de referencia y la variante con arginina en la posición 150 permitió evidenciar diferencias relevantes en la red de interacciones moleculares que estabilizan el complejo enzima–ligando.

En la estructura cristalográfica nativa, el modo de unión de zanamivir se caracterizó por la tríada de argininas (Arg118, Arg292 y Arg371), que establece interacciones iónicas con el grupo carboxilato del inhibidor y conforma el núcleo electrostático del complejo. Adicionalmente, se observaron enlaces de hidrógeno críticos con Glu119 y Glu227, así como contactos directos con Asp151 dentro del loop 150 y un puente mediado por agua hacia Arg152.

En contraste, la estructura con la mutación S150R mostró alteraciones en el patrón de interacciones. Aunque se conservaron enlaces con residuos clave como Asp151, Arg118, Arg224, Arg292 y Arg371, la sustitución introdujo restricciones estéricas adicionales que limitaron la orientación óptima del inhibidor. La formación de un único puente salino (con Arg292) y la presencia de contactos desfavorables entre el grupo guanidinio de zanamivir y el residuo Arg152 sugieren que el cambio de serina a arginina podría reducir la complementariedad espacial del complejo. Este efecto ha sido descrito en estudios previos que asocian modificaciones en el loop 150 con variaciones en la accesibilidad del bolsillo catalítico y potenciales disminuciones en la afinidad por inhibidores de la neuraminidasa, específicamente por zanamivir como lo mencionan Han y colaboradores (2012).

Cabe destacar que, a pesar de que las interacciones principales del inhibidor con la tríada de argininas se conservaron, la redistribución de la red polar y la introducción de interacciones

desfavorables podrían traducirse en un complejo menos estable. En este sentido, la sustitución S150R podría estar modulando la dinámica conformacional del loop 150, lo cual tendría implicaciones en la eficacia del acoplamiento de zanamivir y, potencialmente, en la sensibilidad antiviral. Este hallazgo adquiere mayor relevancia al considerar que, en las secuencias analizadas de México durante 2022, la prevalencia de esta mutación alcanzó el 94,64%, lo que sugiere que se trata de un evento adaptativo que merece especial atención en la vigilancia farmacogenómica del virus influenza A(H3N2).

CONCLUSIONES

El análisis de las cepas de influenza A(H3N2) circulantes en México durante 2022 reveló mutaciones emergentes en la neuraminidasa asociadas con valores atípicos de IC₅₀ frente a zanamivir. Destaca la alta prevalencia de la sustitución S150R (94,64 % de las secuencias analizadas) y la presencia de la mutación T238A en el 28,3 % de los aislamientos mexicanos.

Los análisis estructurales mostraron que S150R se localiza en el loop 150 (residuos 147–152), una región flexible que delimita el bolsillo catalítico y es esencial para la unión de inhibidores. La sustitución de serina por arginina en esa posición introdujo restricciones estéricas adicionales y redujo el número de enlaces de hidrógeno críticos en la interacción con zanamivir, generando contactos desfavorables con Arg152.

Los resultados indican que S150R modifica la dinámica del loop 150 y reduce la eficacia del acoplamiento del fármaco, con un potencial impacto en la sensibilidad antiviral.

La rápida fijación de S150R en México, desplazando a la serina ancestral en casi la totalidad de los aislamientos de 2022, sugiere un evento de adaptación viral. La emergencia de T238A en más de una cuarta parte de las cepas refuerza la relevancia de las variantes raras a nivel mundial.

BIBLIOGRAFÍA

- Carter, T., & Iqbal, M. (2024). The Influenza A Virus Replication Cycle: A Comprehensive Review. *Viruses*, 16(2), 316. <https://doi.org/10.3390/v16020316>
- Creytens, S., Pascha, M., Ballegeer, M., Saelens, X., & de Haan, C. (2021). Influenza Neuraminidase Characteristics and Potential as a Vaccine Target. *Frontiers in Immunology*, 12, 786617. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.786617>
- Dirección General de Epidemiología, D. (2018, diciembre 28). *INFORMACIÓN RELEVANTE DE INFLUENZA. TEMPORADA DE INFLUENZA 2017-2018/Semana20*. <https://www.gob.mx/salud/acciones-y-programas/informes-semanales-para-la-vigilancia-epidemiologica-de-influenza-2018>
- Du, R., Cui, Q., Chen, Z., Zhao, X., Lin, X., & Rong, L. (2022). Revisiting influenza A virus life cycle from a perspective of genome balance. *Virologica Sinica*, 38(1), 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.virs.2022.10.005>
- Ellis, D., Lederhofer, J., Acton, O. J., Tsybovsky, Y., Kephart, S., Yap, C., Gillespie, R. A., Creanga, A., Olshefsky, A., Stephens, T., Pettie, D., Murphy, M., Sydeman, C., Ahlrichs, M., Chan, S., Borst, A. J., Park, Y.-J., Lee, K. K., Graham, B. S., ... Kanekiyo, M. (2022). Structure-based design of stabilized recombinant influenza neuraminidase tetramers. *Nature Communications*, 13(1), 1825. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-29416-z>
- Ensayo NAI (CI50)*. (s/f). Recuperado el 6 de abril de 2025, de <https://www.isirv.org/site/index.php/methodology/nai-assay-ic50>
- Franco-May, D. A., Gómez-Carballo, J., Barrera-Badillo, G., Cruz-Ortiz, M. N., Núñez-García, T. E., Arellano-Suárez, D. S., Wong-Arámbula, C., López-Martínez, I., Wong-Chew, R. M., & Ayora-Talavera, G. (2024). Low antiviral resistance in Influenza A and B viruses isolated in Mexico from 2010 to 2023. *Antiviral Research*, 227, 105918. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2024.105918>
- Gubareva, L., & Mohan, T. (2022). Antivirals Targeting the Neuraminidase. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 12(1), a038455. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a038455>
- Han, N., Liu, X., & Mu, Y. (2012). Exploring the Mechanism of Zanamivir Resistance in a Neuraminidase Mutant: A Molecular Dynamics Study. *PLoS ONE*, 7(9), e44057. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0044057>
- Hendling, M., & Barišić, I. (2019). In-silico Design of DNA Oligonucleotides: Challenges and Approaches. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 17, 1056–1065. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2019.07.008>
- Hernández Altamirano, J. D. (2024). *Secuenciación genómica de aislados de virus de influenza a en la zona metropolitana de Monterrey: Análisis filogenético y su relación con la resistencia a los antivirales*.
- Holmes, E. C., Hurt, A. C., Dobbie, Z., Clinch, B., Oxford, J. S., & Piedra, P. A. (2021). Understanding the Impact of Resistance to Influenza Antivirals. *Clinical Microbiology Reviews*, 34(2), e00224-20. <https://doi.org/10.1128/CMR.00224-20>
- Jagadesh, A., Salam, A. A. A., Mudgal, P. P., & Arunkumar, G. (2016). Influenza virus neuraminidase (NA): A target for antivirals and vaccines. *Archives of Virology*, 161(8), 2087–2094. <https://doi.org/10.1007/s00705-016-2907-7>

- Jiang, L., Chen, H., & Li, C. (2023). Advances in deciphering the interactions between viral proteins of influenza A virus and host cellular proteins. *Cell Insight*, 2(2), 100079. <https://doi.org/10.1016/j.cellin.2023.100079>
- Knight, M. L., Fan, H., Bauer, D. L. V., Grimes, J. M., Fodor, E., & Keown, J. R. (2021). Structure of an H3N2 influenza virus nucleoprotein. *Acta Crystallographica. Section F, Structural Biology Communications*, 77(Pt 7), 208. <https://doi.org/10.1107/S2053230X2100635X>
- Kuchipudi, S. V., Nelli, R. K., Gontu, A., Satyakumar, R., Surendran Nair, M., & Subbiah, M. (2021). Sialic Acid Receptors: The Key to Solving the Enigma of Zoonotic Virus Spillover. *Viruses*, 13(2), Article 2. <https://doi.org/10.3390/v13020262>
- Kumari, R., Sharma, S. D., Kumar, A., Ende, Z., Mishina, M., Wang, Y., Falls, Z., Samudrala, R., Pohl, J., Knight, P. R., & Sambhara, S. (2023). Antiviral Approaches against Influenza Virus. *Clinical Microbiology Reviews*, 36(1), e00040-22. <https://doi.org/10.1128/cmr.00040-22>
- Lampejo, T. (2020). Influenza and antiviral resistance: An overview. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 39(7), 1201–1208. <https://doi.org/10.1007/s10096-020-03840-9>
- Matsuki, E., Kawamoto, S., Morikawa, Y., & Yahagi, N. (2023). The Impact of Cold Ambient Temperature in the Pattern of Influenza Virus Infection. *Open Forum Infectious Diseases*, 10(2), ofad039. <https://doi.org/10.1093/ofid/ofad039>
- McAuley, J. L., Gilbertson, B. P., Trifkovic, S., Brown, L. E., & McKimm-Breschkin, J. L. (2019). Influenza Virus Neuraminidase Structure and Functions. *Frontiers in Microbiology*, 10, 39. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00039>
- Meseko, C., Sanicas, M., Asha, K., Sulaiman, L., & Kumar, B. (2023). Antiviral options and therapeutics against influenza: History, latest developments and future prospects. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2023.1269344>
- Modelo de ratón de la cepa H3N2—Diagnóstico creativo.* (s/f). Recuperado el 29 de mayo de 2025, de <https://antiviral.creative-diagnostics.com/h3n2-strain-mouse-model.html>
- Mögling, R., Richard, M. J., Vliet, S. V. D., Beek, R. V., Schrauwen, E. J. A., Spronken, M. I., Rimmelzwaan, G. F., & Fouchier, R. A. M. (2017). Neuraminidase-mediated haemagglutination of recent human influenza A(H3N2) viruses is determined by arginine 150 flanking the neuraminidase catalytic site. *Journal of General Virology*, 98(6), 1274–1281. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000809>
- Moreira, E. A., Yamauchi, Y., & Matthias, P. (2021). How Influenza Virus Uses Host Cell Pathways during Uncoating. *Cells*, 10(7), 1722. <https://doi.org/10.3390/cells10071722>
- Neuraminidasa / sialidasa del virus de la gripe: Sus características, nomenclatura, medida de actividad, cinética, inhibidores agentes terapéuticos – Anales RANF.* (s/f). Recuperado el 23 de junio de 2025, de https://analesranf.com/articulo/88ex_07/
- Nuwarda, R. F., Alharbi, A. A., & Kayser, V. (2021). An Overview of Influenza Viruses and Vaccines. *Vaccines*, 9(9), Article 9. <https://doi.org/10.3390/vaccines9091032>
- Ortomixovirus | ICTV.* (s/f). Recuperado el 11 de marzo de 2025, de https://ictv.global/report_9th/RNANeg/Orthomyxoviridae
- Peukes, J., Xiong, X., Erlendsson, S., Qu, K., Wan, W., Calder, L. J., Schraidt, O., Kummer, S., Freund, S. M. V., Kräusslich, H.-G., & Briggs, J. A. G. (2020). The native structure of the

- assembled matrix protein 1 of influenza A virus. *Nature*, 587(7834), 495–498.
<https://doi.org/10.1038/s41586-020-2696-8>
- Rabie-Rudsari, M., Behboudi, E., Ranjkesh, A., Kaveh, K., Razavi-Nikoo, H., Haghshenas, M. R., & Moradi, A. (2024). Molecular identification of neuraminidase gene mutations in influenza A/H1N1 and A/H3N2 isolates of Mazandaran province, north of Iran. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 36, 466–472. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2023.10.025>
- Shamsian, S., Sokouti, B., & Dastmalchi, S. (2024). Benchmarking different docking protocols for predicting the binding poses of ligands complexed with cyclooxygenase enzymes and screening chemical libraries. *BioImpacts : BI*, 14(2), 29955.
<https://doi.org/10.34172/bi.2023.29955>
- Singh, N., Anjum, N., & Chandra, R. (2019). Combating influenza: Natural products as neuraminidase inhibitors. *Phytochemistry Reviews*, 18(1), 69–107.
<https://doi.org/10.1007/s11101-018-9581-1>
- Singh, P. P., Sodhi, K. K., Bali, A. K., & Shree, P. (2023). Influenza A virus and its antiviral drug treatment options. *Medicine in Microecology*, 16, 100083.
<https://doi.org/10.1016/j.medmic.2023.100083>
- Skelton, R. M., & Huber, V. C. (2022). Comparing Influenza Virus Biology for Understanding Influenza D Virus. *Viruses*, 14(5), 1036. <https://doi.org/10.3390/v14051036>
- Świerczyńska, M., Mirowska-Guzel, D. M., & Pindelska, E. (2022). Antiviral Drugs in Influenza. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 19(5), Article 5.
<https://doi.org/10.3390/ijerph19053018>
- Taylor, G., & Russell, R. (2010). Chapter 16—Influenza Virus Neuraminidase Inhibitors. En R. A. Bradshaw & E. A. Dennis (Eds.), *Handbook of Cell Signaling (Second Edition)* (pp. 103–110). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374145-5.00016-4>
- 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>
- Zhu, Z., Fodor, E., & Keown, J. R. (2023). A structural understanding of influenza virus genome replication. *Trends in Microbiology*, 31(3), 308–319.
<https://doi.org/10.1016/j.tim.2022.09.015>