

Glicobiología del virus de la influenza A

Maria Eugenia Florres-Munguía,* Luz Vázquez-Moreno,* Gabriela Ramos-Clamont Montfort *

RESUMEN. El reconocimiento específico de las hemagglutininas (HA) del virus de la influenza A hacia los carbohidratos de las células de los vertebrados, es la señal que permite al virus unirse a la célula para replicarse e infectar al huésped y también para perpetuarse, estableciendo reservorios naturales en diferentes especies. Las HA de los virus que atacan a aves, reconocen sialiloligosacáridos con ácidos siálicos unidos a galactosa en la posición α 2-3. Esto les permite replicarse en células intestinales produciendo una infección entérica que se disemina a través de las heces. Para cruzar la barrera de las especies y atacar al humano, la especificidad de la HA cambia, reconociendo ahora estructuras con ácidos siálicos en posición α 2-6. Esta permuta, aparentemente sencilla, provoca que el virus se replique en las células del sistema respiratorio humano. Las alteraciones en la especificidad de la HA se favorecen por diversos mecanismos de variación genética debidos a la naturaleza segmentada del ARN del virus. Estos mecanismos requirieron además de un intermediario, el cerdo, cuyo sistema respiratorio presenta tanto estructuras sialiladas en α 2-3 como en α 2-6 y por tanto es susceptible a virus que atacan a aves y humanos. El virus aviar se adapta en el cerdo para poder atacar al humano y esta adaptación se favorece en situaciones de co-infección. Sin embargo, actualmente existen cepas que son capaces de transmitirse directamente del ave al humano sin necesidad de un intermediario. Estas cepas han acumulado y siguen adquiriendo variaciones en su información genética que las capacitan para poder desencadenar una nueva pandemia de influenza.

Palabras clave: Virus de la influenza aviar, hemagglutinina, especificidad por carbohidratos, ácido siálico.

INTRODUCCIÓN

La influenza es una enfermedad respiratoria aguda provocada por virus de la familia *orthomyxoviridae*. En los humanos es muy contagiosa, de elevada morbilidad y capaz de provocar complicaciones letales. La transmisión se lleva a cabo por aerosoles en gotas diseminadas a través de la tos o de los estornudos.⁴⁷ Las características del genoma del virus de la influenza permiten el intercambio de material genético continuo, dando lugar a nuevas varian-

ABSTRACT. The ability of influenza A virus hemagglutinins (HA) to recognize specific carbohydrates located in vertebrate cells is the signal that allows virus attachment and replication at viral infection. This biological recognition also permits viral maintenance in their natural reservoir, wild aquatic birds or other species. Receptor binding specificity of HA is dependent on the species of origin. In birds, influenza virus binds to glycoconjugates that contain α 2,3-linked sialic acid found in avian intestinal cells. To cross the species barrier and infect human cells, HA specificity must change to bind to glycoconjugates containing α 2, 6-linked sialic acid. This apparently simple change allows the avian influenza virus to replicate in the human respiratory system. Avian influenza virus may acquire HA genes from a human pathogenic strain, by passing through an intermediate host, the pig, which contains both α (2,3) and α (2,6) sialic acid in the respiratory epithelium and is therefore susceptible to both avian and human influenza. Since influenza virus has a segmented genome, mutations and or recombination events in viral genes can readily occur if a cell is infected with two different viruses. Furthermore, there is now evidence that some avian viral strains can infect human cells without intermediate hosts. These new strains are in continue evolution and can accumulate mutations leading to a possible influenza pandemic.

Key words: Avian influenza virus, hemagglutinins, carbohydrate specificity, sialic acid.

tes antigénicas que causan epidemias anuales en la población. Periódicamente emergen nuevos subtipos del virus ante los que el sistema inmune humano se encuentra desprotegido. Estas cepas han provocado pandemias de graves consecuencias como la de 1918, que acabó con la vida de más de 20 millones de personas en el mundo, y otras de menor mortalidad que ocurrieron en los años 1957 y 1968.⁴²

Estudios filogenéticos y de secuenciación de los ácidos nucleicos del virus de la influenza, indican que las cepas que atacan a los mamíferos, derivan de los virus de la influenza aviar, cuyo reservorio habitual son las aves acuáticas salvajes.^{42,78} En las aves, la influenza es una enfermedad entérica que se disemina a través de las heces; generalmente es benigna para las aves salvajes y mortal en las aves de corral. El virus es capaz de mutar y adaptarse para poder replicarse en las células de los mamíferos, en donde la infección se presenta en las vías respiratorias. Lo anterior se encuentra relacionado directamente al tipo de

* Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C. Coordinación de Ciencia de los Alimentos. Carretera a la Victoria Km. 0.6. Hermosillo, Sonora. 83,000. Tel. y fax (662) 280-00-58.

carbohidratos que contienen las glicoproteínas y los glicolípidos, que se localizan en la superficie de la membrana celular del huésped.

Diversas áreas de la Biología han jugado un papel muy importante en el descubrimiento del proceso de infección del virus de la influenza. Una de ellas es la Glicobiología, que se encarga del estudio de los carbohidratos y la influencia de éstos en las funciones de las células. Las interacciones proteína-carbohidrato, juegan un papel crucial en el biorreconocimiento del virus por la célula huésped; según el tipo de oligosacáridos que reconozca el virus, será el tipo de especie y célula al que se pueda unir y por lo tanto infectar. Las estructuras de los oligosacáridos (carbohidratos) que el virus reconoce en las aves, no son frecuentes en humanos. Es por ello que el patógeno requiere de un intermediario como el cerdo, cuyas mucosas contienen estructuras oligosacáridas encontradas tanto en aves como en humanos.⁶ Lo anterior posibilita la variación genética del virus permitiéndole adquirir la capacidad de infectar al humano. Sin embargo, la influenza causada por la cepa H5N1 que circula actualmente por el Mundo, es capaz de transmitirse directamente de aves a humanos, como lo demuestran los casos ocurridos en Asia a partir de 1997. Es por ello que el estudio de la glicobiología del virus es importante para diseñar nuevas estrategias para su control.

CONCEPTOS BÁSICOS

Existen tres tipos de virus de la familia *orthomyxoviridae* A, B y C, que son capaces de causar influenza. Los dos primeros están compuestos por 8 segmentos de ácido ribonucleico (ARN) antisentido, mientras que el último presenta 7.¹¹¹ El virus del tipo C es muy co-

mún, causa infecciones respiratorias leves e incluso asintomáticas, por ello no se considera un problema de salud pública. El virus tipo B causa epidemias esporádicas más severas, particularmente en ambientes escolares. Tanto los virus B como C son esencialmente humanos, aunque eventualmente el virus B puede infectar a las focas y el C a los cerdos.⁴ El virus de la influenza A es de mayor importancia para la salud pública y la industria pecuaria, ya que es el causante de las grandes pandemias de influenza en humanos y también es capaz de atacar a las aves de corral, a cerdos, a caballos y a mamíferos marinos.¹⁶

El diámetro del virus de la influenza A (Fig. 1) oscila entre 80 y 120 nm, presenta una envoltura formada por una bicapa lipídica que se deriva de la membrana de la célula huésped donde se replicó; su forma es esférica o filamentosa y está cubierto por proyecciones denominadas espinas o spikes.⁹⁷ Los 8 segmentos del ARN del virus codifican para 10 proteínas. Las polimerasas (PA, PB1 y PB2) y la nucleocápside (NP) que se encuentran asociadas a los genes y las proteínas de la matriz (M1 y M2) asociadas a la envoltura. También se encuentran las proteínas no estructurales (NS1 y NS2) y dos glicoproteínas superficiales (spikes), una con actividad de neuraminidasa (NA) y la otra con actividad de lectina o hemaglutinina (HA).¹¹¹

El virus de la influenza A se clasifica en subtipos de acuerdo a las diferencias genéticas y serológicas asociadas en menor grado con la proteína M y principalmente con las dos glicoproteínas superficiales NA y HA.^{63,65} Existen 9 diferentes neuraminidasas (N1 a N9) de las cuales la N1 y la N2 se encuentran en los virus que atacan a los humanos. La neuraminidasa es una enzima importante para la liberación de los viriones después que se replican en la célula huésped.¹¹¹ Por otro lado, se conocen 16 tipos de

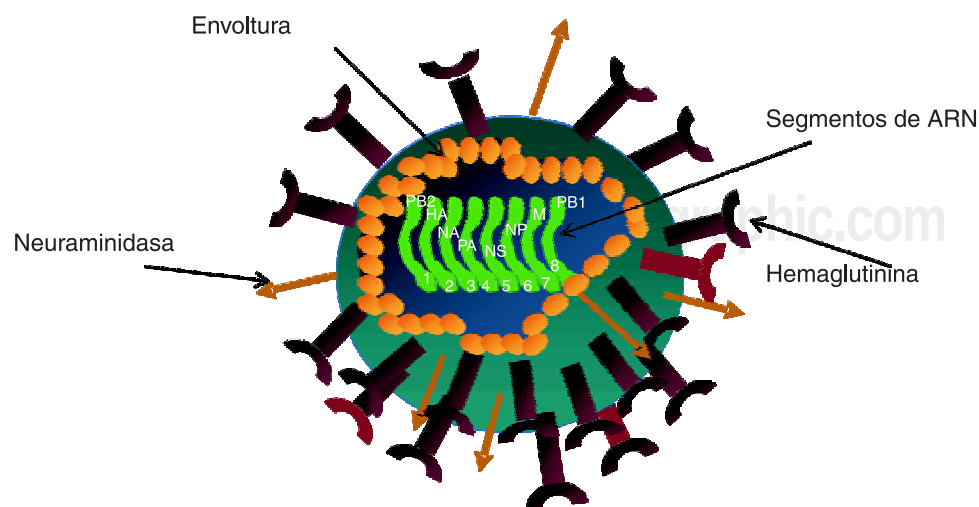


Figura 1. Esquema del virus de la influenza aviar.

hemagglutininas (H1 a H16) que intervienen en el reconocimiento del virus por la célula huésped.⁶³ Las diferentes combinaciones de N y H se encuentran perpetuadas en las aves acuáticas del mundo, donde el virus actúa de manera benigna.⁴ Sin embargo, cuando estos virus se transmiten a las aves de corral y a los mamíferos, evolucionan rápidamente, dando lugar en algunos casos a cepas de gran virulencia.¹⁶

De los 16 subtipos de hemagglutininas, la H5 y la H7 han causado graves daños en la industria pecuaria, mientras que los subtipos H6, H9 y H3, se encuentran en proceso de establecimiento en las aves de corral.⁵⁴ En los humanos, los subtipos H1, H2 y H3 han sido los causantes de pandemias y epidemias, mientras que los subtipos H5, H7 y H9 se han transmitido de las aves a los humanos. Estos tres últimos tipos están catalogados actualmente como posibles causantes de una futura pandemia.^{50,53,54,86}

Los virus de la influenza presentan una gran variación genética, es por ello que continuamente se aíslan diversos subtipos que deben catalogarse adecuadamente. La clasificación estándar de los virus de la influenza debe indicar el tipo (A, B, o C), el lugar en donde se realizó el aislamiento inicial, el huésped en que fue aislado (si se aisló en humano no se indica), la cepa, el año del aislamiento y, si el virus es tipo A, la hemagglutinina y neuraminidasa correspondientes. Por ejemplo el A/chicken/Mexico/232/94 (H5N2) es un virus de la influenza tipo A aislado de pollo en México, la cepa es la 232, se aisló en 1994, expresa la hemagglutinina 5 y la neuraminidasa 2.⁹⁷

IMPORTANCIA BIOLÓGICA DE LA HEMAGLUTININA DEL VIRUS DE LA INFLUENZA A

La hemagglutinina (HA) del virus de la influenza es un trímero en forma de punta que mide de 10 a 40 nm de longitud. La HA aglutina los eritrocitos de humano, pollo y cobayo. Sus funciones, primordiales para la replicación del virus, son las de promover su adhesión a la célula y fusionarlo a su membrana.⁸⁵ La HA del virus de la influenza A actúa como lectina que reconoce, según su especificidad, a diferentes tipos de ácido siálico (Sia). Este es un carbohidrato terminal que se expresa frecuentemente en glicoproteínas y glicolípidos de las células epiteliales respiratorias o intestinales, a las que se adhiere el virus.¹¹⁵

El virón de la influenza contiene cerca de 350 a 400 trímeros de HA en su superficie. El sitio que se une a los ácidos siálicos de las células está formado por una secuencia específica de aminoácidos, localizada en la cabeza globular de la hemagglutinina.¹¹⁷ Las interacciones atómicas que se establecen entre los residuos de aminoácidos de la hemagglutinina y los sialiloligosacáridos de los receptores celulares son débiles ($K_d > 10^{-4}$ M). Sin embargo, la fuerza

con que el virus interacciona con la célula está dada por el cooperativismo creado por la unión de múltiples moléculas de hemagglutinina con múltiples receptores, como se muestra en la figura 2A.^{26,56,58}

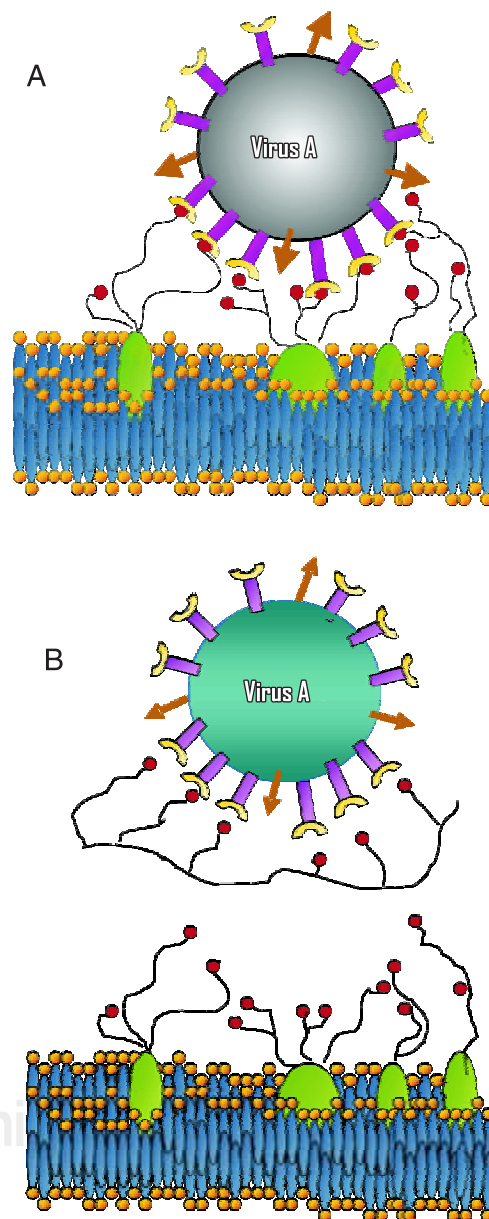


Figura 2. Reconocimiento de la hemagglutinina (HA) del virus de la influenza aviar por estructuras sialiloligosacáridas. A), la HA reconoce a los sialiloligosacáridos de glicoproteínas y glicolípidos en las células del tracto respiratorio humano iniciando el proceso de infección. B). La adhesión del virus a la célula puede prevenirse en presencia de sialiloligosacáridos con estructuras similares a las que reconoce la HA.

Los sialiloligosacáridos que pueden actuar como receptores del virus de la influenza son muy diversos.⁷⁹ Lo anterior se debe a que existen varios tipos de ácido siálico. También influye la clase de enlace glicosídico que presente este ácido con el siguiente carbohidrato al que esté ligado. Las estructuras más comunes presentan un ácido siálico unido a galactosa (Gal) por un enlace glicosídico tipo alfa que se establece entre el carbono número 2 del siálico y los carbonos 3 ó 6 de la galactosa [Sia (α 2-3) Gal y Sia (α 2-6) Gal]. También son importantes los carbohidratos internos en el sialiloligosacárido y si éstos se encuentran unidos a una proteína o a un lípido.^{26,56} Actualmente la tecnología a base de microarreglos de carbohidratos (del inglés glycan arrays), permite analizar una gran cantidad de estructuras complejas de sialiloligosacáridos con el fin de determinar que otros carbohidratos, además de la galactosa, son importantes en el reconocimiento de la HA por la célula del huésped.

El virus de la influenza A que ataca a humanos presenta gran afinidad por estructuras que contienen al ácido siálico N acetil neuramínico (Neu5Ac) unido a galactosa mediante un enlace α 2-6 [Neu5Ac (α 2-6) Gal]. Estas estructuras son muy abundantes tanto en las mucosas como en las células de las vías respiratorias humanas.^{3,49} Por otro lado los virus de las aves acuáticas presentan mayor especificidad por estructuras que contienen Neu5Ac (α 2-3) Gal, las cuales se encuentran en mayor proporción en las mucosas intestinales de las aves.^{40,66} Los virus de la influenza equina y porcina se unen tanto al Neu5Ac como al ácido N-glicolilneuramínico o Neu5Gc.⁹⁵ En los caballos, el virus se une a estructuras Neu5Ac (α 2-3) Gal presentes en sus tráqueas, es por ello que los virus que infectan a las aves, pueden atacar a los caballos. En los cerdos existen estructuras tanto Neu5Ac (α 2-3) Gal como Neu5Ac(α -6) Gal, de modo que estos animales se infectan con virus de aves y virus humanos.¹¹¹ De lo anterior se deriva que la habilidad del virus para replicarse en las células de una especie específica, está dada por el tipo de ácido siálico que presentan y la manera en que éste se une a la galactosa.

Esta diferencia limita la transferencia del virus entre especies. En los primeros años de las pandemias de Asia y Hong Kong de 1997, los virus de ave que atacaron a humanos, presentaban hemaglutininas específicas tanto por uniones (α 2-3) como (α 2-6), lo cual sugiere un cambio gradual en especificidad que permitió el salto de la barrera de las especies.^{14,25,27,57} El proceso de adaptación de los virus de ave, para replicarse en células humanas, se lleva a cabo en los cerdos, ya que en su tráquea existen estructuras sialiladas en (α 2-3) y (α 2-6).^{111,113} Esto aumenta la posibilidad de transmisión del virus del cerdo a los humanos. Así ocurrió durante 1993 en Holanda en que se presentó la transmisión de la cepa aviar adaptada en cerdo H3N2 a dos niños.^{6,12} Es importante resaltar, que los cerdos son el ma-

yor reservorio de las cepas H1N1 (probable causante de la influenza española de 1918) y H3N2 (causante de la pandemia de Hong Kong 1968). Por otro lado, la frecuente introducción de otros tipos de virus de la influenza en este animal puede dar lugar a la generación de nuevas cepas y a la posible transmisión de las mismas al humano.⁶

REPLICACIÓN DEL VIRUS

Una vez que las hemaglutininas se unen a los oligosacáridos de la membrana de la célula a infectar, la HA se escinde, activándose de esta manera para iniciar el siguiente paso de la infección.⁸⁵ El rompimiento de la molécula se lleva a cabo por la acción de proteasas presentes en la misma célula huésped. Esto da lugar a la formación de dos subunidades, el extremo carboxilo terminal o HA1, que conserva la capacidad de reconocer al ác. siálico y el extremo amino terminal o HA2, que es necesario para que el virus se fusione a la membrana de la célula hospedera. Es importante destacar que si la célula blanco carece de las proteasas para escindir a la HA, el virus no se replica.^{4, 82} La proteasa involucrada en la escisión de la HA en humanos, es la tripsina Clara, una serina proteasa que producen las células Clara del epitelio bronquial.⁴³ Por otro lado, las HA de cepas de escasa virulencia para las aves de corral, son escindidas por enzimas como la tripsina que únicamente se encuentra en determinadas células del intestino del huésped.⁸² En cambio, en la HA de las cepas que resultan más patógenas para las aves y que pueden transmitirse a humanos, como la H7 y la H5, el rompimiento se lleva a cabo por enzimas ubicuas tipo subtilisina, como la furina dependiente de calcio.^{8,91} Lo anterior permite que el virus pueda atacar diversos tejidos del organismo causando una infección sistémica que puede llevar a la muerte del organismo infectado. Aparentemente el cambio de especificidad de las proteasas por la HA se debe a mutaciones de esta molécula en las que se expresan secuencias ricas en aminoácidos básicos como la arginina y la lisina.^{82,102,119} En las HA de los virus más benévolos sólo se encuentran dos aminoácidos básicos, reconocidos únicamente por proteasas específicas. En cambio, en las cepas de alta patogenicidad existen secuencias polibásicas en la HA, que aumentan la susceptibilidad de ésta al ataque de proteasas menos específicas.⁷ Por lo tanto, un virus con estas características podrá replicarse no sólo en el aparato respiratorio humano, sino también en las células de diferentes órganos incluido el cerebro.⁵⁵

Después del rompimiento de la HA, el siguiente paso es la internalización del virus a la célula huésped, por endocitosis. Dentro del endosoma, la proteína M1 del virus facilita la entrada de iones hidrógeno. Lo anterior provoca la disminución del pH y a su vez un cambio conformacio-

nal de la HA2 que expone las regiones hidrofóbicas de la proteína, fusionando la envoltura vírica con la membrana del endosoma. Esto permite la liberación de la nucleocápside al citoplasma y su transporte hacia el núcleo, donde la información genética del virus es transcrita por el ARN mensajero (ARNm) de la célula.⁸⁵ Posteriormente los ribosomas traducen la información codificando a las 10 proteínas virales.^{73,74} La hemaglutinina y la neuraminidasa sufren modificaciones postraduccionales en el retículo endoplásmico y en el aparato de Golgi de la célula, donde se les adicionan carbohidratos que contribuyen en la funcionalidad de ambas proteínas.^{4,87}

Una vez que las proteínas NP, M1, M2, NA y HA del virus han sido sintetizadas, son transportadas en vesículas hasta la membrana celular. En la parte externa quedan incrustadas la NA y la HA, en la interna, las proteínas de matriz y la nucleocápside. Esta región de la membrana se convertirá posteriormente en la envoltura de los viriones.^{85,87} Los segmentos del genoma del virus producidos en el núcleo, se transportan al citoplasma de la célula, donde se asocian a la nucleocápside y a las polimerasas (PA, PB1 y PB2). Los 8 segmentos del genoma se incorporan en cada virión.⁸⁷ Después del ensamblaje de los virus se produce su liberación causando la lisis celular. La neuraminidasa (NA), actúa desdoblado a algunas glicoproteínas presentes en células del huésped, facilitando la salida y diseminación del virus.^{13,31,53,72}

Al igual que la hemaglutinina, la neuraminidasa es muy importante para la invasión y liberación del virus. La NA facilita el acceso del virus a la célula al degradar a las estructuras del mucus que la recubre. La NA también desialila a la $\alpha 2$ macroglobulina del sistema inmune del huésped impidiendo la neutralización del virus.¹⁰⁷ Durante la liberación del virus la NA desdobla a las glicoproteínas del huésped que contienen ac. siálico, para poder escapar de la célula. También se cree que esta enzima desialila a algunos de los carbohidratos de la HA, previniendo la agregación de los virus.

Los viriones contienen aproximadamente 50 moléculas homotetraméricas de NA.² La especificidad de la NA debe coincidir con el tipo de tejidos a los que el virus ataca y por tanto, también está ligada a la especificidad de la HA; de allí que la NA de virus aviares presente especificidad para estructuras con enlaces Sia ($\alpha 2-3$) Gal, mientras que la NA de virus humanos rompe enlaces Sia ($\alpha 2-3$) Gal. Debido a que la HA y la NA tienen actividades contrarias, debe existir un balance entre estas dos, ya que un exceso en el rompimiento de estructuras sialiladas por la acción de la NA podría dejar sin receptores a la HA, impidiendo la adhesión a la célula huésped. La figura 3 resume la importancia de la HA y la NA en la replicación del virus.

Los virus de la influenza de aves se replican en el tracto gastrointestinal, mientras que los de humanos y otros mamíferos, en el tracto respiratorio.⁴ Esta diferencia se debe fundamentalmente, como ya se explicó, al tipo de enlace

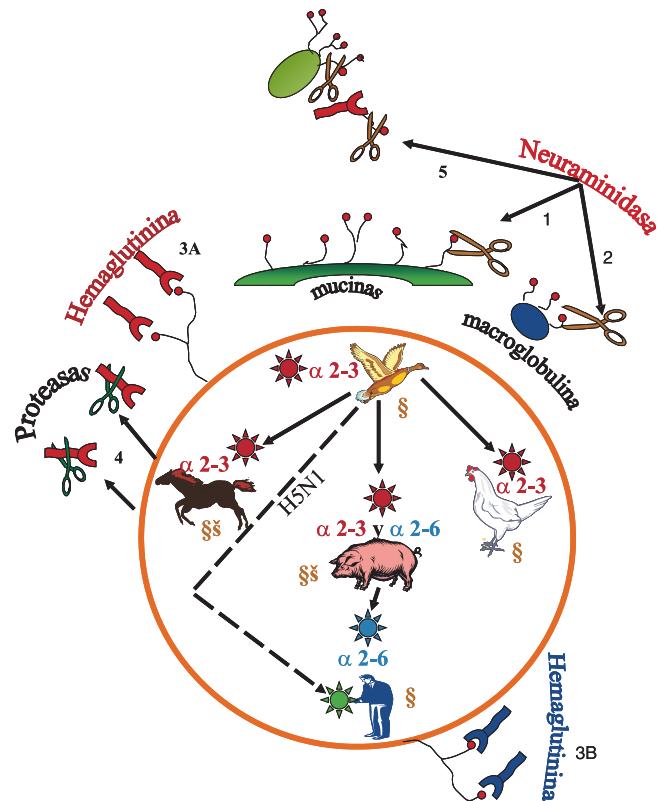


Figura 3. Importancia de la hemaglutinina (HA) y la neuraminidasa (N) en la invasión del virus de la influenza aviar. Los huéspedes del virus están delimitados en el círculo naranja. El ataque del virus se basa en la especificidad de la HA y de la NA por el tipo de enlace que establece el ácido siálico con la galactosa. El reservorio natural son las aves acuáticas salvajes que transmiten el virus a aves de corral, equinos y cerdos, debido a que cuentan con el mismo tipo de receptores (siálico a 2-3), reconocidos por las HA rojas. El cerdo actúa como intermediario del virus hacia el hombre porque sus células también contienen el mismo receptor del humano (siálico a 2-6), reconocido por las HA azules. Sin embargo el H5N1 infecta directamente al hombre. Las aves y el hombre únicamente expresan ac. siálico N-acetilneuramínico (S), mientras que en cerdos y equinos se encuentra también el ac. Siálico N-glicolilneuramínico (S) El primer paso de la infección es el reconocimiento de receptores celulares a los que el virus se une. 1 y 2, la neuraminidasa rompe el ácido siálico de moléculas que pudieran servir de receptoras impidiendo la unión del virus a la célula, como las mucinas y la 2 macroglobulina. 3. La hemaglutinina reconoce a los receptores de membrana uniéndose a las células de aves, cerdos o equinos (3A, hemaglutininas rojas) o de cerdos y humanos (3B, hemaglutininas azules). 4. Las proteasas de la célula cortan a la hemaglutinina permitiendo la fusión del virus y su replicación en el núcleo celular 5. Una vez que el virus se ha replicado la neuraminidasa facilita la liberación de los viriones de la célula infectada rompiendo los enlaces de ácido siálico de las glicoproteínas celulares y de la HA, esto último previene la aglutinación de los viriones. Modificada de Baigent y McCauley.⁴

de los ácidos siálicos presentes en los tejidos. Parece ser además, que la NA también influye en este tropismo, ya que las neuraminidasas de los virus aviares son más activas a las temperaturas altas (40 °C) y pH bajos del intestino de las aves, mientras que las NA de los virus humanos no.^{4,22,36} Los virus humanos no pueden replicarse en el tracto gastrointestinal del pato.⁴⁵ Sin embargo, el virus H5N1 aislado en Hong Kong puede replicarse en intestino humano causando severos síntomas gastrointestinales. Lo anterior puede estar relacionado con cambios en los aminoácidos del sitio activo de la NA, provocados por mutaciones debidas a la variabilidad genética que presenta el virus.^{3,4}

GLICOSILACIÓN DEL VIRUS DE LA INFLUENZA

Un aspecto importante que no debe pasar desapercibido es la adición de carbohidratos a las proteínas virales superficiales y el efecto de esta modificación en el ciclo de vida del virus y en su capacidad infectiva. Como ya se indicó tanto la HA como la NA se glicosilan con N-oligosacáridos en el retículo endoplásmico y en el aparato de Golgi de las células infectadas.⁴⁴ De manera general la glicosilación incide en por lo menos dos aspectos importantes del ciclo de vida del virus.¹⁰⁶ En primer lugar, esta modificación promueve el plegamiento apropiado de las proteínas y facilita su transporte hacia la membrana gracias al reconocimiento lectina-carbohidrato que se establece con las proteínas chaperonas de la célula calnexina y calreticulina.^{18,48} En segundo lugar, la glicosilación puede facilitar tanto la interacción del virus con su receptor, como la evasión al sistema inmune.¹⁰³

En el caso de la HA tanto la cabeza globular como el pedúnculo fibroso de los 3 homodímeros que la constituyen, pueden estar glicosilados en regiones donde se presenta la secuencia Asn-X-Ser/Thr, donde X puede ser cualquier aminoácido, excepto prolina.³⁵ Se sabe que la presencia de estos oligosacáridos puede ser tanto perjudicial como benéfica para la replicación del virus. Por ejemplo, como ya se indicó, la escisión o activación de la HA por las proteasas celulares es el primer paso para la entrada del virus a la célula y la susceptibilidad de la HA hacia proteasas celulares específicas, determina el tropismo y la virulencia del virus. Deshpande et al.,²⁰ observaron que en los virus H5N2 la glicosilación cercana a la cabeza globular de la HA protege a la hemaglutinina de la acción de las proteasas celulares, disminuyendo la posibilidad de entrada del virus a la célula. En cambio, otros estudios muestran que la presencia de oligosacáridos cerca de la región de interacción de la HA es crucial para la invasión y la liberación del virus. Lo anterior debido a que los carbohidratos modulan la afinidad con que la HA se une a su re-

ceptor. En ausencia de glicosilación la unión de la HA con el receptor de la célula huésped puede ser más intensa y por tanto se requerirá de una neuraminidasa muy activa para que el virus pueda liberarse.^{66,108}

Desde su introducción en la especie humana en 1918, el virus H1N1 ha evolucionado aumentando sus sitios de glicosilación a 4, en la región globular de su HA. Por otro lado, la cepa pandémica H3N2 evolucionó de 2 sitios a 6 sitios glicosilados en la región globular.^{81,117,118} Esto llevó a pensar que la presencia de oligosacáridos cerca de la cabeza globular de la HA puede enmascarar sitios antigénicos del virus. Lo anterior fue comprobado por Abe et al.¹ y Vigerust et al.¹⁰⁴ quienes glicosilaron intencionalmente la cabeza globular de la HA del virus H3N2 observando un aumento en su capacidad para evadir al sistema inmune.

El grupo de Abe también confirmó los hallazgos de Klenk al encontrar una disminución en la afinidad de la unión de la HA con su receptor, sin que se viera afectada su capacidad infectiva. Un efecto contrario se observa con virus que expresan HA del tipo H2, donde el aumento en la glicosilación de la cabeza globular afecta significativamente la capacidad de fusión del virus a la célula huésped.⁹⁸ El hecho de que la cepa H2N2 que ha infectado a humanos muy pocas veces no haya sufrido cambios en su glicosilación a través del tiempo, apoya la idea de que la glicosilación es una modificación importante para la replicación del virus de la influenza en humanos.

La glicosilación en la cabeza globular de la HA varía de cepa a cepa. En cambio, los sitios de glicosilación en la región peduncular o fibrosa de la hemaglutinina son más conservados. Se observan sitios de N-glicosilación en la Asn¹² y la Asn⁴⁷⁸ en todas las secuencias de HA y en la Asn²⁸ de la mayoría de las cepas analizadas.^{39,59,62} Utilizando virus recombinantes en los que se inhibió la glicosilación de los sitios antes mencionados, se observó que la ausencia de carbohidratos en estas regiones aumenta la susceptibilidad del virus al pH y a la temperatura, afectando sensiblemente la capacidad del virus para invadir a la célula.¹⁰⁶⁻¹⁰⁸

La NA del virus de la influenza también es una glicoproteína transmembranal con una cabeza globular y un pedúnculo anclado a la membrana.⁵¹ Se sabe que en la parte globular pueden hallarse hasta 4 sitios de glicosilación.¹¹⁰ Tanto los virus del tipo A como B presentan un sitio de glicosilación conservado en la Asn¹⁴⁶ (numerada a partir de la N2). El oligosacárido de este sitio contiene una N-acetilgalactosamina, carbohidrato que no se ha encontrado en ninguno de los oligosacáridos de la HA. Existen evidencias de que este oligosacárido es crucial para el plegado y el transporte de la NA y de que también influye en la neurovirulencia del virus.^{5,49,51} Como podemos obser-

var la glicosilación de la HA y la NA juega un papel importante en la funcionalidad del virus de la influenza. Actualmente se investiga cómo influye este tipo de modificación en la resistencia de algunos virus de la influenza al tratamiento con inhibidores de neuraminidasa.

RIESGOS DE UNA NUEVA PANDEMIA DEL VIRUS DE LA INFLUENZA AVIAR

A lo largo de la historia de la humanidad los virus de la influenza A han sido de gran preocupación para la salud pública, debido a su capacidad de provocar tanto epidemias como pandemias en humanos y animales. Las epidemias de influenza son brotes restringidos que comienzan abruptamente atacando con mayor frecuencia a los niños, aunque la mayor mortalidad se presenta en los ancianos y en pacientes inmunocomprometidos.^{21,94} Las epidemias llegan a su punto máximo entre las 2 y 3 semanas, presentado una duración de 5 a 6 semanas.³⁰ En el Hemisferio Norte, se presentan principalmente entre los meses de noviembre a marzo, mientras que en el Sur entre abril y septiembre.⁹⁴ Las epidemias son causadas por la variación antigénica del virus; cada nueva variante antigénica desplaza a sus predecesoras, de tal manera que los periodos de co-circulación de dos variantes son muy cortos. Es por ello que cada año debe desarrollarse una nueva vacuna. Durante la década pasada, las nuevas variantes epidémicas han sido detectadas por primera vez en China y de allí se han extendido a otras partes del mundo.^{17,84}

Por otro lado las pandemias de influenza surgen a intervalos impredecibles y como consecuencia de la aparición de nuevos virus con antígenos de superficie de un subtipo totalmente diferente del de las cepas circulantes. En los últimos 120 años se han presentado cuatro reordenamientos o cambios antigénicos mayores (del inglés antigenic shift) que dieron origen a las pandemias de 1889-1891, 1918-1920, 1957-1958 y 1968-1969.⁷⁸ Debido a que la población no posee inmunidad contra las nuevas cepas, la enfermedad ataca a toda la población causando gran mortalidad y expandiéndose rápidamente, gracias al crecimiento de la población y a las modernas vías de comunicación. Existe discrepancia sobre el origen de la pandemia de "influenza española" de 1918-1919 ya que algunos investigadores sugieren que se originó en China, mientras que otros indican que fue en los campos militares de Estados Unidos. La pandemia de 1957 inició en Guizhou China y la de 1968-1969 en Hong Kong.^{15,24,29,71,97} El riesgo de una nueva pandemia en la actualidad, proviene de estas mismas regiones, donde se han generado nuevas cepas del virus para las cuales nuestro sistema inmune no presenta protección.

Actualmente se considera a los subtipos del virus H2, H5, H6, H7 H9 y H10 como potencialmente transmisibles

y peligrosos para los humanos.³ Los principales son aquellos subtipos aviares que pueden infectar directamente a los humanos, sin necesidad de adaptarse en un intermediario. Ejemplos de ellos son las cepas H9N2, H7N7 y H5N1.^{2,11,111}

El subtipo H7 siempre ha sido de importancia veterinaria debido su capacidad de desarrollar cepas altamente virulentas para las aves de corral. En 1996 el virus H7N7 fue aislado de los ojos de una mujer inglesa que se dedicaba a la crianza de patos y que presentaba infección por conjuntivitis.⁴⁷ En el 2003 una cepa altamente patogénica del H7N7 provocó un brote infeccioso en Holanda, causando la muerte de una persona e infectando a otras 85 de conjuntivitis.^{23,46} Esta variante se originó de una cepa H7N7 aislada de pato en Holanda en el año 2000.⁴⁶ Existen indicios de que la H7 continúa evolucionando ya que en el 2004, se aisló la cepa H7N3 en dos humanos de la Columbia Británica que se contagiaron a partir de pollos.³⁷ La cepa H9N2 de origen asiático, ha cruzado la barrera de las especies atacando a aves y a humanos, debido a que sus hemaglutininas pueden unirse tanto estructuras sialiladas en α 2-3 como en α 2-6.^{52,60} El H9N2 ha seguido evolucionando; además de reordenamientos de su ARN, ha sufrido diversas mutaciones que pudieran, con el tiempo, dar lugar a cepas más virulentas.³ Otro virus que parece haber cruzado la barrera de las especies es el H10N7 que fue aislado en niños egipcios con síntomas respiratorios en el 2004. Sin embargo, la cepa que causa mayor preocupación en el mundo es la H5N1.

En 1997 el virus H5N1 causó una grave epidemia en tres granjas de pollos de Hong Kong, provocando una mortalidad del 75% de las aves afectadas.¹¹ En mayo del mismo año la cepa sufrió modificaciones genéticas que le permitieron atacar a un niño, causándole la muerte por neumonía con severas complicaciones.^{8,19,93} Después de 6 meses se presentó un nuevo brote del virus en Hong Kong, infectando a 17 personas y causando la muerte de 5. Nuevos brotes en aves aparecieron en 2001, 2002 y 2004. A la fecha, el virus ha evolucionado en el genotipo Z, altamente patogénico para varias especies.³ El H5N1 ha causado la muerte de más de 150 millones de aves en Europa y Asia. En Azerbaijón, Camboya, China, Indonesia, Irak, Tailandia, Turquía, Vietnam y Egipto, el virus ha pasado de aves a humanos, resultando en 274 casos y 167 muertes desde el 2003 hasta el 19 de febrero del 2007.⁶⁹ El principal reservorio del genotipo Z son los patos del sur de China.⁵⁰ Actualmente este virus se ha expandido en aves de 45 países, probablemente a través de aves migratorias y del movimiento comercial de las aves de corral.

Se cree que el genotipo Z es producto de reordenamientos entre el ARN de diferentes cepas, del H5N1 con el del

H9N2 y/o del H6N1.^{32,113} Como producto de estos cambios, la hemaglutinina del H5N1, ha sufrido modificaciones estructurales que permiten la evasión del virus al sistema inmune. Dichos cambios pudieran estar relacionados con la presencia de carbohidratos entre los aminoácidos 154-156 de la HA, los cuales presentarían estructuras similares a epítopos humanos.³ De esta manera, el sistema inmune dejaría de reconocer al virus como algo extraño. El genotipo Z también presenta una mutación en la posición 627 de la proteína PB2, la cual se asocia a un incremento de la virulencia.^{23,33} A la fecha, el H5N1 no ha adquirido la capacidad de transmitirse de humano a humano, sin embargo, los continuos cambios evolutivos que experimenta podrían dar lugar a un nuevo subtipo capaz de provocar una nueva pandemia de influenza.^{101,112}

De los virus H5N1 aislados y estudiados a la fecha, el A/Vietnam/1203/2004 (Viet04) es el más patogénico para los mamíferos.^{55,89} Este virus se aisló originalmente de un niño vietnamita que murió de influenza aviar. Se han investigado las características estructurales de la HA de este virus con el fin de tratar de entender qué tipo de mutaciones influyen en cambio de especificidad de la HA hacia receptores humanos y que otras intervienen en la patogenicidad del virus. Las comparaciones estructurales del Viet04 con virus de la influenza humanos, aviares y porcinos indican que la conformación de la HA del Viet04 está muy relacionada con la de la HA del virus que provocó la pandemia de 1918.⁹⁰ Una similitud importante es un puente de hidrógeno que se establece entre la Asn⁶⁸ y la Asn⁸¹ que estabiliza a las hélices de la HA2. Otros detalles estructurales relacionados con la capacidad de fusión del virus a la membrana del huésped, como la formación de parches hidrofóbicos ricos en histidina, también se presentan en el Viet04. Por otro lado, la HA de este virus presenta una secuencia polibásica de aminoácidos que le permite ser escindida por proteasas ubicuas, posibilitando una infección sistémica.⁹⁰

Las investigaciones realizadas para determinar que tipo de mutaciones inducen el cambio de especificidad de la HA para reconocer Sia α 2-6 en vez de Sia α 2-3 son muy importantes, ya que este cambio permite al virus replicarse en células humanas. En este sentido los resultados son diversos y falta mucho por entender, debido a que la adaptación de los diferentes serotipos de virus hacia los receptores humanos puede ocurrir por diversos mecanismos.

En los serotipos H2 y H3 la mutación de Gln²²⁶ y Gly²²⁸ por Leu²²⁶ y Ser²²⁸ es suficiente para permitir que el virus reconozca a células humanas.^{14,27,58,105} Por el contrario en la HI en el virus de 1918 el cambio en especificidad es evidente al cambiar Glu¹⁹⁰ y Gly²²⁵ por Asp¹⁹⁰ y Asp²²⁵ respectivamente.²⁸ En virus H1 también se han detectado diferencias en las posiciones 186 (Pro en aves, Ser en

humanos) y 225, donde presentan un residuo de Gly en aves, y uno de Asn en humanos. Se piensa que estos cambios están asociados con la adaptación de los virus de aves a través de los cerdos, para poder reconocer estructuras (α 2-6) y así infectar a los humanos.⁵⁸ Sin embargo, al inducir las mismas mutaciones de H2, H3 y H1 (1918) en la HA del H5N1 Viet04, no se observaron aumentos dramáticos en la afinidad por Sia α 2-6 aunque si hubo disminución por Sia α 2-3 y un aumento por la afinidad de estructuras (α 2-6), cuando se indujeron en el Viet 04 las mismas mutaciones que en H3. Lo anterior pudiera ser una ruta para los virus H5N1 para poder replicarse en las células del pulmón humano.⁹⁰ Esta hipótesis se robustece con los resultados de Yamada et al.¹²⁰ quienes estudiaron la especificidad de la HA de otros virus H5N1 aislados en humanos, encontrando que reconocen tanto estructuras sialiladas en α 2-6 como en α 2-3.

Los resultados del grupo de Yamada también indican que el cambio de Asn¹⁸² por Lys¹⁸² y el de Gly¹⁹² por Arg¹⁹² aumentan la especificidad de los virus H5N1 Thai/KAN y VN/3028IIc13 respectivamente, por receptores humanos. Sin embargo, es necesario estudiar otros virus H5N1; también, investigar los cambios conformacionales que las mutaciones inducen, para comprender mejor el cambio de especificidad de las HA. Por otro lado, los resultados de otros grupos de investigación indican que existen mutaciones en otras proteínas virales no superficiales, como la PB2, que también son necesarias para conferir al virus un estatus completamente pandémico que le permita replicarse eficientemente en los humanos.^{83,92}

El H5N1 se ha establecido en los patos del sur de Asia y de allí a las aves de corral y en menor proporción, al humano. La transmisión se favorece debido a prácticas culturales que permiten la convivencia entre las aves acuáticas y las de corral en los traspatios de las granjas y los hogares chinos. Las escasas condiciones higiénicas en estas granjas han promovido el paso del genotipo Z de los patos a los pollos, a través de las heces.¹¹¹ Otra condición adversa en este país, es el uso de gallinaza en los tanques de acuicultura para fertilizarlos. Esta práctica promueve la diseminación del virus a través de las aves acuáticas que llegan a los estanques.⁸⁰ Por otro lado, las explotaciones intensivas que promueven la cercanía entre granjas de aves y cerdos, como las que actualmente se desarrollan en Estados Unidos, implican un riesgo que puede promover la transmisión entre estos animales permitiendo al cerdo servir de intermediario del virus hacia el hombre.¹¹¹ Debido a lo anterior, la primera estrategia para controlar la expansión de la cepa H5N1 es prevenir el acceso del virus en las granjas de pollos y cerdos. Lo anterior se está intentando mediante el establecimiento de medidas de higiene y bioseguridad en las granjas desde el 2004.^{111,113}

ALTERNATIVAS DE PROTECCIÓN CONTRA EL H5N1 EN EL HUMANO

La vacunación es la principal estrategia para proteger al organismo humano. A la fecha, 16 compañías en 10 países están desarrollando diferentes tipos de vacunas humanas contra la influenza provocada por el H5N1.¹⁰ Los análisis genómicos y antigénicos indican que en la actualidad existen dos linajes (clade 1 y 2) de H5N1 con diferente distribución geográfica. Los virus del clade 1 causaron infecciones humanas entre el 2004 y 2005 en Camboya, Tailandia y Vietnam, mientras que el clade 2, en sus diferentes sublinajes (1, 2, y 3) ha causado infecciones después del 2005 en Indonesia (sublinaje 1) en Medio Oriente, Europa y África (sublinaje 2) y en China (sublinaje 3).¹¹⁴ Debido a lo anterior se requiere crear una vacuna capaz de proteger al humano contra todos los sublinajes circulantes.

Los principios establecidos para la investigación de la influenza humana en general, se aplican también al desarrollo de vacunas para la cepa pandémica H5N1. Sin embargo, existen algunas dificultades para el desarrollo de esta vacuna que incluyen: la alta patogenicidad del H5N1, la escasa inmunogenicidad de la HA del tipo H5, así como la información tan dispersa que existe sobre los sitios antigénicos de las HA aviares y su correlación con la protección que ejerce el sistema inmune.¹⁰

Debido a que la HA y la NA son los principales blancos de la respuesta inmune, se han enfocado diversos estudios hacia la producción de anticuerpos específicos contra estas glicoproteínas.¹⁰ Los anticuerpos contra HA son capaces de prevenir la infección, mientras que los dirigidos contra la NA la contienen, al impedir la liberación del virus de la célula infectada.⁷⁵ La principal desventaja de la producción de estos anticuerpos es la posibilidad de que sean poco efectivos, debido al gran número de mutaciones que las glicoproteínas del virus puedan sufrir en un tiempo relativamente corto. Los anticuerpos dirigidos contra otras proteínas del virus confieren escasa protección o resultan inefectivos.^{5,64}

Las vacunas producidas a partir de virus inactivos proveen al sistema inmune de todos los factores antigénicos, sin embargo, son poco inmunogénicas. Debido a lo anterior se investigan nuevos tipos de adyuvantes para mejorar la respuesta inmune.¹⁰⁰ Para la producción de vacunas inactivas deben seleccionarse virus antigénicamente similares a los H5N1 circulantes.³⁸ Para ello se está investigando con virus H5N1 aviares de baja patogenicidad, que puedan crecer efectivamente en huevo.

También se trabaja en la producción de vacunas a partir de H5N1 altamente virulentos capaces de replicarse en humanos. En este caso se utilizan tecnologías de genética re-

versa para inducir transformaciones en el virus que atenuen su patogenicidad, permitiendo su crecimiento en embriones de huevo.^{88,96} Esta tecnología también se emplea para la construcción de partículas víricas, a partir de ADN complementario de los segmentos de ARN del virus.^{3,70,111} Lo anterior implica la creación de variantes del virus en el laboratorio, con reordenamientos genéticos definidos y dirigidos, que correspondan a las características antigénicas de la cepa causante de la pandemia y en los que se elimine deliberadamente la secuencia de aminoácidos de la hemaglutinina asociada a la alta virulencia del virus.^{3,70} La producción de la cepa resultante de la genética reversa, debe llevarse a cabo en una línea celular que cumpla con todos los requisitos internacionales de seguridad y que esté certificada para la producción de vacunas para humano. Otros tipos de vacunas que están en estudio son las vacunas con virus atenuados, las que se desarrollan a base de HA purificada y las vacunas a partir de de ADN viral.¹⁰

Para la prevención y el tratamiento temprano de la influenza, existen fármacos antivíricos cuyo uso a gran escala podría reducir la morbilidad y posiblemente la mortalidad ante una pandemia, en el caso en que se retrase la disponibilidad de una vacuna eficaz.⁶⁷ Los fármacos disponibles son de dos clases; los primeros inhiben a la proteína M2 mientras que los segundos son inhibidores de la neuraminidasa. Los inhibidores de la M2 como la amantadina y la rimantadina, bloquean el flujo de iones hidrógeno necesario para el rompimiento de la HA.¹⁰⁹ Sus principales desventajas son la asociación de la amantadina con efectos adversos dosis dependientes y la adquisición de resistencia del virus durante el tratamiento.³⁴ Las variantes resistentes pueden reemplazar a las cepas sensibles a los 2-4 días del comienzo del tratamiento.^{67,68} Los inhibidores de la NA como el zanamivir y el oseltamivir son más costosos, pero tienen menos efectos adversos que los inhibidores de la M2.³ No se ha descrito resistencia primaria a los inhibidores de la neuraminidasa entre los aislados clínicos en ensayos de inhibición enzimática, y estos fármacos son activos frente a los nueve subtipos de NA reconocidos en los virus de influenza aviar.⁶¹ Actualmente la Organización Mundial de Salud urge a todos los países del Mundo a contar con suficientes reservas de antivirales en prevención de una posible pandemia.

GLICOBIOLOGÍA Y PREVENCIÓN DE LA INFLUENZA

Además de los anticuerpos que el organismo puede crear en defensa del virus, existe una serie de moléculas presentes en la sangre, en las secreciones mucosas y en extractos de tejidos y animales, que pueden establecer interacciones con el patógeno. Algunas de estas moléculas contienen sialiloligosacáridos (ie, α macroglobulina,

ovomucina y diversos proteoglicanos) que son reconocidos por la HA del virus obstaculizando la interacción polivalente de éste con la célula, como se observa en la figura 2A. La efectividad de estos compuestos sialilados de origen natural depende del tipo y número de ácidos siálicos que posea, del tamaño y flexibilidad de la molécula y de su resistencia a la digestión de la NA del virus.^{56,76} Basándose en este principio natural en el que las moléculas de defensa intervienen por competencia en la adhesión lectina (HA)-carbohidrato (receptor celular), varios glicobiólogos trabajan actualmente en la síntesis de diversos tipos de sialiloligosacáridos, con el fin de probar su capacidad para ser reconocidos por el virus y, de esta manera “secuestrarlo” impidiendo su adhesión a la célula huésped.^{41,56}

La efectividad de los compuestos sintetizados se ensaya determinando su capacidad de inhibir la hemaglutinación provocada por el virus, o la inhibición de la adhesión de éste a diferentes líneas celulares.⁵⁶ Las moléculas sintéticas en presentación multivalente, es decir que contienen varios sitios sialilados, se encuentran entre las más efectivas; además se ha observado una correlación directa entre la masa del componente y su efectividad, por lo que actualmente, se sintetizan sialopolímeros multivalentes cuya efectividad para inhibir al virus es 1,000 veces más efectiva que la α 2 macroglobulina equina, que es el inhibidor natural más potente.^{9,56,116} Sin embargo, debido a que cada cepa presenta variaciones en el reconocimiento de los sialiloligosacáridos,^{41,77,99} es necesario determinar con mayor exactitud el tipo de sialiloligosacárido que sea reconocido con mayor afinidad por la HA de las cepas potencialmente peligrosas. Actualmente, el desarrollo de nuevas tecnologías como los microarreglos de carbohidratos, permite probar una gran cantidad de estructuras sialiladas en menor tiempo. Lo anterior contribuirá al desarrollo de la aplicación de la terapia a base de estructuras conteniendo carbohidratos, encaminadas a la prevención de la enfermedad.

CONCLUSIONES

Las interacciones proteína-carbohidrato establecidas entre la hemaglutinina viral y los receptores celulares de aves y mamíferos, son cruciales para que el virus de la influenza pueda replicarse y perpetuarse. La especificidad de la HA por estructuras sialiladas en α 2-3 o α 2-6 determinan la especie y el tejido en que el virus puede reproducirse. Los cambios en la especificidad de la HA se deben a variaciones genéticas del virus y permitieron el cruce de la barrera de las especies entre aves y mamíferos. Dichos cambios requirieron en algunos casos, de un intermediario como el cerdo, cuyos tejidos cuentan con los dos tipos de

estructuras. Sin embargo, en la actualidad existen cepas de aves que pueden atacar directamente a humanos sin pasar por el cerdo. En éstas, han surgido variaciones genéticas como la expresión de secuencias de aminoácidos que aumentan la virulencia; la expresión de oligosacáridos en la estructura de la HA que permiten la evasión del sistema inmune y mutaciones que permiten el reconocimiento de una misma HA por estructuras sialiladas en α 2-3 y α 2-6. La transmisión de los virus H5N1, H7N3, H7N7 y H9N2 de las aves a los humanos desde 1997 es una señal de alerta que no debe pasar desapercibida para el sector salud. A partir de esta fecha los virus han adquirido variaciones genéticas que les están permitiendo cumplir los 3 prerrequisitos necesarios para iniciar una pandemia. Es decir, son cepas nuevas ante las que el sistema inmune humano se encuentra desprotegido. Pueden replicarse en las células humanas causando un grave daño a la salud y únicamente les falta adquirir la capacidad de transmitirse de un humano a otro. La evidencia muestra que la virulencia que adquiere el virus al pasar de una especie a otra, está asociada con cambios genéticos que resultan de mutaciones, reordenamientos o recombinaciones de su ARN.

Los virus siguen cambiando y no se sabe en qué momento pueden adquirir la capacidad de transmitirse de humano a humano. Las vacunas anuales son incapaces de controlarlos pues están dirigidas hacia otras cepas. La producción de vacunas efectivas estará en función de las características de la cepa que inicie la pandemia. Es por ello que se debe contar con suficientes tratamientos profilácticos que incluyan a inhibidores de la neuraminidasa y de la proteína M. Otro factor importante es el control de la transmisión del virus en aves de corral el cual debe establecerse en todos los países. Las condiciones óptimas para el reordenamiento del ARN viral se dan cuando diferentes especies coexisten en la misma granja o en un lugar cercano. Sin embargo queda mucho por clarificar acerca de los mecanismos moleculares de la transmisión entre especies y la manera de prevenirla. Un mayor conocimiento de estos mecanismos permitirá la producción de vacunas y el diseño de medicamentos más efectivos.

REFERENCIAS

1. Abe, Y., E. Takashita, K. Sugawara, Y. Matsuzaki, Y. Muraki, & S. Hongo. 2004. Effect of the addition of oligosaccharides on the biological activities and antigenicity of influenza A/H3N2 virus hemagglutinin. *J. Virol.* 78:9605-9611.
2. Air, G.M., & W.G. Laver. 1989. The neuraminidase of influenza virus. *Proteins.* 6: 341-356.
3. Alvarado de la Barrera, C., & G. Reyes-Terán. 2005. Influenza: Forecast for a Pandemic. *Arch. Med. Res.* 36:628-636.
4. Baigent, S.J., & J.W. McCauley. 2003. Influenza type A in humans, mammals and birds: determinants of virus viru-

- lence, host-range and interspecies transmission. *BioEssays*. 25:657-671.
5. Black, R.A., P.A. Rota, N. Gorodkova, H.D. Klenk, & A.P. Kendal. 1993. Antibody response to the M2 protein of influenza A virus expressed in insect cells. *J. Gen. Virol.* 74:143-146.
 6. Brown, I.H. 2001. The pigs as an intermediate host for influenza A viruses between birds and humans. *Int. Congress Series*. 1219:173-178.
 7. Capua, I., & D.J. Alexander. 2002. Avian influenza and human health. *Acta Tropica* 83:1-6.
 8. Chen, J., H.L. Lee, D.A. Steinhauer, D.J. Stevens, J.J. Skehel & D.C. Wiley. 1998. Structure of the hemagglutinin precursor cleavage site, a determinant of influenza pathogenicity and the origin of the labile conformation. *Cell* 95:409-417.
 9. Choi, S.K., M. Mammen, & G.M. Whitesides. 1997. Generation and in situ evaluation of libraries of poly(acrylic acid) presenting sialosides as side chains as polyvalent inhibitors of influenza-mediated hemagglutination. *J. Am. Chem. Soc.* 119:4103-4111.
 10. Cinatl, J. Jr., M. Michaelis, & H.M. Doerr. 2007. The threat of avian influenza A (H5N1). Part IV: development of vaccines. *Med. Microbiol. Immunol.* 196:213-225.
 11. Claas, E.C., A.D. Osterhaus, R. van Beek, J.C. de Jong, G.F. Rimmelzwaan, D.A. Senne, S. Krauss, K.F. Shortridge, & R.G. Webster. 1998. Human influenza A (H5N1) virus related to highly pathogenic avian influenza virus. *Lancet* 351:472-477.
 12. Claas, E.C.J., Y. Kawaoka, J.C. de Jong, N. Masurel, & R.G. Webster. 1994. Infection of children with avian-human reassorting influenza virus from pigs in Europe. *Virology* 204:453-457.
 13. Compans, R.W., N.J. Dimmock, & H. Meier-Ewert. 1969. Effect of antibody to neuraminidase on the maturation and hemagglutinating activity of an influenza A2 virus. *J. Virol.* 4:528-534.
 14. Connor, R.J., Y. Kawaoka, R.G. Webster, & J.C. Paulson. 1994. Receptor specificity in human, avian and equine H2 and H3 influenza virus isolates. *Virology* 205:17-23.
 15. Cox, N. J., & K. Subbarao. 1999. Influenza. *Lancet* 354: 1277-1282.
 16. Cox, N.J., & K. Subbarao. 2000. Global epidemiology of influenza: Past and present. *Annu. Rev. Med.* 51:407-421.
 17. Cox, N.J., T.L. Brammer, & H.L. Regnery. 1994. Influenza: global surveillance for epidemic and pandemic variants. *Eur. J. Epidemiol.* 10:467-470.
 18. Daniels, R., B. Kurowski, A.E. Johnson, & D.N. Hebert. 2003. N-linked glycans direct the cotranslational folding pathway of influenza hemagglutinin. *Mol. Cell* 11:79-90.
 19. De Jong, J.C. 1997. A pandemic warning. *Nature* 389:554.
 20. Deshpande, K.L., V.A. Fried, M. Ando, & R.G. Webster. 1987. Glycosylation affects cleavage of an H5N2 influenza virus hemagglutinin and regulates virulence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 84: 36-40.
 21. Ellis, S.E., C.S. Coffey, E.F. Mitchel, R.S. Dittus, & M.R. Griffin. 2003. Influenza and respiratory syncytial virus-associated morbidity and mortality in the nursing home population. *J. Am. Geriatr. Soc.* 51(6):761-767.
 22. Fiszcon, B., C. Hannoun, A. Garcia-Sastre, E. Villar, & J.A. Cabezas. 1989. Comparison of biological and physical properties of human and animal A(H1N1) influenza viruses. *Res. Virol.* 140:395-404.
 23. Fouchier, R.A., P.M. Schneeberger, F.W. Rozendaal, J.M. Broekman, S.A. Kemink, V. Munster, T. Kuiken, G.F. Rimmelzwaan, M. Schutten, G.J. van Doornum, G. Koch, A. Bosman, M. Koopmans, & A.D. Osterhaus. 2004. Avian influenza A virus (H7N7) associated with human conjunctivitis and a fatal case of acute respiratory distress syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 101(5):1356-1361.
 24. Frost, W.H. 1919. The epidemiology of influenza. *JAMA* 73:313-318.
 25. Gambaryan, A.S., A.B. Tuzikov, V.E. Piskarev, S.S. Yamnikova, D. Lvov, J.S. Robertson, N.V. Bovin, & M.N. Matrosovich. 1997. Specification of receptor-binding phenotypes of influenza virus isolates from different hosts using synthetic sialylglycopolymers: non-egg-adapted human H1 and H3 influenza A and influenza B viruses share a common high binding affinity for 6'-sialyl (N-acetyl)lactosamine. *Virology* 232:345-350.
 26. Gambaryan, A.S., S. Yamnikova, D. Lvov, A. Tuzikov, A. Chinarev, G. Pazynina, R. Webster, M. Matrosovich, & N. Bovin. 2005. Receptor specificity of influenza viruses from birds and mammals: New data on involvement of the inner fragments of the carbohydrate chain. *Virology* 334:276-283.
 27. Gambaryan, A.S., V.E. Piskarev, I.A. Yamskov, A.M. Sakharov, A.B. Tuzikov, N.V. Bovin, N.E. Nifantev, & M.N. Matrosovich. 1995. Human influenza virus recognition of oligosaccharides. *FEBS Lett.* 366:57-60.
 28. Glaser, L., J. Stevens, D. Zamarin, I. A. Wilson, A. Garcia-Sastre, T. M. Tumpey, C. F. Basler, J. K. Taubenberger, & P. Palese. 2005. A Single Amino Acid Substitution in 1918 Influenza Virus Hemagglutinin Changes Receptor Binding Specificity. *J. Virol.* 79:11533-11536.
 29. Glezen, W.P. 1996. Emerging infections: pandemic influenza. *Epidemiol. Rev.* 18:64-76.
 30. Glezen, W.P., & R.B. Couch. 1978. Interpandemic influenza in the Houston area, 1974-76. *N. Engl. J. Med.* 298:587-592.
 31. Griffin, J.A., S. Basak, & R.W. Compans. 1983. Effects of hexose starvation and the role of sialic acid in influenza virus release. *Virology* 125:324-334.
 32. Guan, Y., J.S. Peiris, A.S. Lipatov, T.M. Ellis, K.C. Dyrting, S. Krauss, L.J. Zhang, R.G. Webster, & K.F. Shortridge. 2002. Emergence of multiple genotypes of H5N1 avian influenza viruses in Hong Kong SAR. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 99:8950-8955.
 33. Hatta, M., P. Gao, P. Halfmann, & Y. Kawaoka. 2001. Molecular basis for high virulence of Hong Kong H5N1 influenza A viruses. *Science* 293:1773-1775.
 34. Hayden, F.G. 1996. Amantadine and rimantadine, clinical aspects, pp 59-77. In: D. D. Richman (Ed). *Antiviral Drug Resistance*. John Wiley & Sons Ltd, Chichester, UK.
 35. Helenius, A. & M. Aebi. 2001. Intracellular functions of N-Linked glycans. *Science* 291:2364-2369.
 36. Hinshaw, V.S., R.G. Webster, C.W. Naeve, & B.R. Murphy. 1983. Altered tissue tropism of human-avian reassortant influenza viruses. *Virology*. 128:260-263.
 37. Hirst, M., C.R. Astell, M. Griffith, S.M. Coughlin, M. Moksa, T. Zeng, D.E. Smailus, R.A. Holt, S. Jones, M.A. Marra, M. Petric, M. Krajden, D. Lawrence, A. Mak, R. Chow, D.M. Skowronski, A. Tweed, S. Goh, R.C. Brunham, J. Robinson, V. Bowes, K. Sojony, S.K. Byrne, & M. Paetzel. 2004. A novel avian influenza H7N3 strain associated with an avian influenza outbreak in British Columbia. *Emerg. Infect. Dis.* 10:2192-2195.
 38. Horimoto T, & Y. Kawaoka. 2006. Strategies for developing vaccines against H5N1 influenza A viruses. *Trends. Mol. Med.* 12:506-514.
 39. Inkster, M. D., A.S. Hinshaw, & I.T. Schulze. 1993. The hemagglutinins of duck and human H1 influenza viruses differ in sequence conservation and in glycosylation. *J. Virol.* 67:7436-7443.

40. Ito, T., & Y. Kawaoka. 2000. Host-range barrier of influenza A viruses. *Vet. Microbiol.* 74:71-75.
41. Itoh, M., P. Hetterich, R. Isecke, R. Brossmer, & H.D. Klenk. 1995. Suppression of influenza virus infection by an N-thioacetylneuraminic acid acrylamide copolymer resistant to neuraminidase. *Virology.* 212:340-347.
42. Kawaoka, Y., S.S. Krauss, & R.G. Webster. 1989. Avian-to-human transmission of the PB1 gene of influenza A viruses in the 1957 and 1968 pandemics. *J. Virol.* 63: 4603-4608.
43. Kido, H., Y. Yokogoshi, K. Sakai, M. Tashiro, Y. Kishino, A. Fukutomi, & N. Katunuma. 1992. Isolation and characterization of a novel trypsin-like protease found in rat bronchiolar epithelial Clara cells. A possible activator of the viral fusion glycoprotein. *J. Biol. Chem.* 267:13573-13579.
44. Klenk, H.D., R. Wagner, D. Heuer, & T. Wolff. 2002. Importance of hemagglutinin glycosylation for the biological functions of influenza virus. *Virus Res.* 82:73-75.
45. Kobasa, D., K. Wells, & Y. Kawaoka. 2001. Amino acids responsible for the absolute sialidase activity of the influenza A virus neuraminidase: relationship to growth in the duck intestine. *J. Virol.* 75:11773-11780.
46. Koopmans, M., B. Wilbrink, M. Conyn, G. Natrop, H. van der Nat, H. Vennema, A. Meijer, J. van Steenbergen, R. Fouchier, A. Osterhaus, & A. Bosman. 2004. Transmission of H7N7 avian influenza A virus to human beings during a large outbreak in commercial poultry farms in the Netherlands. *Lancet* 363(9409):587-593.
47. Kurtz, J., R.J. Manvell, & J. Banks. 1996. Avian influenza virus isolated from a woman with conjunctivitis. *Lancet* 348:901-902.
48. Land, A. & I. Braakman. 2001. Folding of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein in the endoplasmic reticulum. *Biochimie* 83:783-790.
49. Lentz, M. R., R. G. Webster, & G. M. Air. 1987. Site-directed mutation of the active site of influenza neuraminidase and implication for catalytic mechanism. *Biochemistry* 26:5351-5358.
50. Li, K.S., Y. Guan, J. Wang, G.J. Smith, K.M. Xu, L. Duan, A.P. Rahardjo, P. Puthavathana, C. Buranathai, T.D. Nguyen, A.T. Estoepongastie, A. Chaisingh, P. Auewarakul, H.T. Long, N.T. Hanh, R.J. Webby, L.L. Poon, H. Chen, K.F. Shortridge, K.Y. Yuen, R.G. Webster, & J.S. Peiris. 2004. Genesis of a highly pathogenic and potentially pandemic H5N1 influenza virus in eastern Asia. *Nature* 430:209-213.
51. Li, S., J. Schulman, S. Itamura, & P. Palese. 1993. Glycosylation of neuraminidase determines the neurovirulence of influenza A/WSN/33 virus. *J. Virol.* 67:6667-6673.
52. Lin, Y.P., M. Shaw, V. Gregory, K. Cameron, W. Lim, A. Klimov, K. Subbarao, Y. Guan, S. Krauss, K. Shortridge, R. Webster, N. Cox, & A. Hay. 2000. Avian-to-human transmission of H9N2 subtype influenza A viruses: relationship between H9N2 and H5N1 human isolates. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97:9654-9658.
53. Liu, C., M.C. Eichelberger, R.W. Compans, & G.M. Air. 1995. Influenza type A virus neuraminidase does not play a role in viral entry, replication, assembly, or budding. *J. Virol.* 69:1099-1106.
54. Liu, M., S. He, D. Walker, N. Zhou, D.R. Perez, B. Mo, F. Li, X. Huang, R.G. Webster, & R.J. Webby. 2003. The influenza virus gene pool in a poultry market in South Central China. *Virology* 305:267-275.
55. Maines, T. R., X. H. Lu, S. M. Erb, L. Edwards, J. Guarner, P.W. Greer, D.C. Nguyen, K.J. Szretter, L.-M. Chen, P. Thawatsupha, M. Chittaganpitch, S. Waicharoen, D.T. Nguyen, T. Nguyen, H.H.T. Nguyen, J.-H. Kim, L.T. Hoang, C. Kang, L.S. Phuong, W. Lim, S. Zaki, R.O. Donis, N.J. Cox, J.M. Katz, & T.M. Tumpey. 2005. Avian influenza (H5N1) viruses isolated from humans in Asia in 2004 exhibit increased virulence in mammals. *J. Virol.* 79:11788-11800.
56. Matrosovich, M.N., & H.D. Klenk. 2003. Natural and synthetic sialic acid-containing inhibitors of influenza virus receptor binding. *Rev. Med. Virol.* 13:85-97.
57. Matrosovich, M.N., A.S. Gambaryan, S. Teneberg, V.E. Piskarev, S.S. Yamnikova, D.K. Lvov, J.S. Robertson, & K.A. Karlsson. 1997. Avian influenza A viruses differ from human viruses by recognition of sialyloligosaccharides and gangliosides and by a higher conservation of the HA receptor-binding site. *Virology* 233:224-234.
58. Matrosovich, M.N., N. Tuzikov, A. Bovin, A. Gambaryan, A. Klimov, M.R. Castrucci, I. Donatelli, & Y. Kawaoka. 2000. Early alterations of the receptor-binding properties of H1, H2, H3 avian influenza virus haemagglutinins after their introduction into mammals. *J. Virol.* 74:8502-8512.
59. Matrosovich, M.N., N. Zhou, Y. Kawaoka, & R. Webster. 1999. The surface glycoproteins of H5 influenza viruses isolated from humans, chickens, and wild aquatic birds have distinguishable properties. *J. Virol.* 73:1146-1155.
60. Matrosovich, M.N., S. Krauss, & R.G. Webster. 2001. H9N2 influenza A viruses from poultry in Asia have human virus-like receptor specificity. *Virology* 281:156-162.
61. McKimm-Breschkin, J.L. 2000. Resistance of influenza viruses to neuraminidase inhibitors, a review. *Antiviral Res.* 47:1-17.
62. Mir-Shekari, S. Y., D.A. Ashford, D.J. Harvey, R.A. Dwek, & I.T. Schulze. 1997. The glycosylation of the influenza A virus hemagglutinin by mammalian cells. A site-specific study. *J. Biol. Chem.* 272: 4027-4036.
63. Moorman, J. 2003. Viral characteristics of influenza. *South Med. J.* 96:758-761.
64. Murphy, B.R., & M.L. Clements. 1989. The systemic and mucosal immune response of humans to influenza A virus. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 146:107-116.
65. Nicholson, K., J. Wood, & M. Zambon. 2003. Influenza. *Lancet* 362:1733-1745.
66. Ohuchi, M., R. Ohuchi, A. Feldmann, & H.-D. Klenk. 1997. Regulation of receptor binding affinity of influenza virus hemagglutinin by its carbohydrate moiety. *J. Virol.* 71:8377-8384.
67. Organización Mundial de la Salud. 2005. Antivíricos, pp. 11-20. En: *Guías de la OMS para el uso de vacunas y antivíricos en las pandemias de influenza*. Organización Mundial de la Salud, Ginebra, Suiza.
68. Organización Mundial de la Salud. 2005. Avian influenza: assessing the pandemic threat. Organización Mundial de la salud. <http://www.who.int/csr/disease/influenza/H5N1-9reduit.pdf>
69. Organización Mundial de la Salud. 2007. Reporte de la Organización Mundial de la Salud del número de casos acumulados de influenza aviar A/(H5N1) en humanos http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/country/cases_table_2007_02_19/en/index.html
70. Ortiz de Lejarazu, R., J.M. Eiros, M.A. Villanueva, A. Delgado & J. Castrodeza. 2002. Investigación en nuevas vacunas antigripales, nuevas vías de administración y nuevas indicaciones. *Vacunas* 3:62-72
71. Palese, P. 2004. Influenza: old and new threats. *Nat. Med.* 10:S82-S87.
72. Palese, P., K. Tobita, M. Ueda, & R.W. Compans. 1974. Characterization of temperature sensitive influenza virus mutants defective in neuraminidase. *Virology* 61:397-410.
73. Plotch, S.J., M. Bouloy, & R.M. Krug. 1979. Transfer of 50-

- terminal cap of globin mRNA to influenza viral complementary RNA during transcription in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 76:1618-1622.
74. Plotch, S.J., M. Bouloy, I. Ulmanen, & R.M. Krug. 1981. A unique cap(m7GpppXm)- dependent influenza virion endonuclease cleaves capped RNAs to generate the primers that initiate viral RNA transcription. *Cell* 23:847-858.
 75. Powers D.C., E.D. Kilbourne, & B.E. Johansson. 1996. Neuraminidase specific antibody responses to inactivated influenza virus vaccine in young and elderly adults. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 3:511-516.
 76. Pritchett, T.J., & J.C. Paulson. 1989. Basis for the potent inhibition of influenza virus infection by equine and guinea pig alpha 2-macroglobulin. *J. Biol. Chem.* 264: 9850-9858.
 77. Reuter, J.D., A. Myc, M.M. Hayes, Z. Gan, R. Roy, D. Qin, R. Yin, L.T. Piehler, R. Esfand, D.A. Tomalia, & J.R. Baker, Jr. 1999. Inhibition of viral adhesion and infection by sialic acid-conjugated dendritic polymers. *Bioconjug. Chem.* 10:271-278.
 78. Roncano-Villamil, G.E. 2005. Influenza aviar: la gripa del pollo. *Infection* 9:139-147.
 79. Schauer, R., & J.P. Kamerling. 1997. Chemistry, biochemistry and biology of sialic acids, pp. 243-402. In: J. Montreuil, J. F.G. Vliegthart, & H. Schachter (Eds). *Glycoproteins II* (New Comprehensive Biochemistry, Vol. 29b), Elsevier Science B.V. Amsterdam, The Netherlands.
 80. Scholtissek, C. & E. Naylor. 1988. Fish farming and influenza pandemics. *Nature* 331:215.
 81. Seidel, W., F. Kunkel, B. Geisler, W. Garten, B. Herrmann, L. Dohner, & H. D. Klenk. 1991. Intraepidemic variants of influenza virus H3 hemagglutinin differing in the number of carbohydrate side chains. *Arch. Virol.* 120:289-296.
 82. Senne, D.A., B. Panigraphy, Y. Kawaoka, J.E. Pearson, J. Suss, M. Lipkind, H. Kida, & R.G. Webster. 1996. Survey of the hemagglutinin (HA) cleavage site sequence of H5 and H7 avian influenza viruses: amino acid sequence at the HA cleavage site as a marker of pathogenicity potential. *Avian Dis.* 40:425-437.
 83. Shinya, K., S. Hamm, M. Hatta, H. Ito, T. Ito, & Y. Kawaoka. 2004. PB2 amino acid at position 627 affects replicative efficiency, but not cell tropism, of Hong Kong H5N1 influenza A viruses in mice. *Virology* 320:258-266.
 84. Simonsen, L., M.J. Clarke, L.B. Schonberger, N.H. Arden, N.J. Cox, & K. Fukuda. 1998. Pandemic versus epidemic influenza mortality: a pattern of changing age distribution. *J. Infect. Dis.* 178:53-60.
 85. Skehel, J., & D. Wiley. 2000. Receptor binding and membrane fusion in virus entry: the influenza haemagglutinin. *Annu. Rev. Biochem.* 69:531-569.
 86. Smolinski, M.S., M.A. Hamburg, & J. Lederberg. 2004. Emerging infectious diseases, pp 23-32. In: M.S. Smolinski, M.A. Hamburg, & J. Lederberg (Eds). *Microbial threats to health: emergence, detection, and response*, National Academies Press, Washington, DC.
 87. Steinhauer, D.A., & J.J. Skehel. 2002. Genetics of influenza viruses. *Annu. Rev. Genet.* 36:305-332.
 88. Stephenson, I., K.G. Nicholson, J.M. Wood, M.C. Zambo, & J.M. Katz. 2004. Confronting the avian influenza threat: vaccine development for a potential pandemic. *Lancet* 4:499-509.
 89. Stevens, J., A. L. Corper, C.F. Basler, J.K. Taubenberger, P. Palese, & I.A. Wilson. Structure of the uncleaved Human H1 hemagglutinin from the extinct 1918 influenza virus. 2004. *Science* 303:1866-1870.
 90. Stevens, J., O. Blixt, T. M. Tumpey, J. K. Taubenberger, J.C. Paulson, & I.A. Wilson. 2006. Structure and receptor specificity of the hemagglutinin from an H5N1 influenza virus. *Science* 312: 404-410.
 91. Stieneke-Gröber, A., M. Vey, H. Angliker, E. Shaw, G. Thomas, C. Roberts, H. D. Klenk, & W. Garten. 1992. Influenza virus hemagglutinin with multibasic cleavage site is activated by furin, a subtilisin-like endoprotease. *EMBO J.* 11(7): 2407-2414.
 92. Subbarao, E.K., W. London, & B.R. Murphy. 1993. A single amino acid in the PB2 gene of influenza A virus is a determinant of host range. *J. Virol.* 67: 1761-1764.
 93. Subbarao, K., A. Klimov, & J. Katz. 1998. Characterization of an avian influenza virus isolated from a child with a fatal respiratory illness. *Science* 279:393-396.
 94. Sullivan, K.M., A.S. Monto, & I.M. Longini. 1993. Estimates of the US health impact of influenza. *Am J. Public. Health.* 83:1712-1716.
 95. Suzuki, Y., T. Ito, T. Suzuki, R. E. Holland Jr, T. M Chambers, M. Kiso, H. Ishida, & Y. Kawaoka. 2000. Sialic acid species as a determinant of the host range of influenza A viruses. *J. Virol.* 74:11825-11831.
 96. Takada, A., N. Kuboki, K. Okazaki, A. Ninomiya, H. Tanaka, H. Ozaki, S. Itamura, H. Nishimura, M. Enami, M. Tashiro, K.F. Shortridge, & H. Kida. 1999. A virulent avian influenza virus as a vaccine strain against a potential human pandemic. *J. Virol.* 73:8303-8307.
 97. Treanor, J.J. 2005. Influenza virus, pp. 2060-2065. In: G. Mandel, J. Bennett, & R. Dolin (Eds). *Principles and practice of infectious diseases*, Sixth edition, Elsevier Churchill Livingstone, Philadelphia.
 98. Tsuchiya, E., K. Sugawara, S. Hongo, Y. Matsuzaki, Y. Muraki, Z.-N. Li, & K. Nakamura. 2002. Effect of addition of new oligosaccharide chains to the globular head of influenza A/H2N2 virus haemagglutinin on the intracellular transport and biological activities of the molecule. *J. Gen. Virol.* 83:1137-1146.
 99. Tuzikov, A.B., N.E. Byramova, N.V. Bovin, A.S. Gambaryan, M.N. Matrosovich. 1997. Monovalent and polymeric 5N-thioacetamido sialosides as tightly-bound receptor analogs of influenza viruses. *Antiviral Res.* 33:129-134.
 100. Ulmer, J.B., U. Valley, & R. Rappuoli. 2006. Vaccine manufacturing: challenges and solutions. *Nat. Biotechnol.* 24:1377-1383.
 101. Ungchusak, K., P. Auewarakul, S.F. Dowell, R. Kitphati, W. Auwanit, P. Puthavathana, M. Uiprasertkul, K. Boonnak, C. Pittayawonganon, N.J. Cox, S.R. Zaki, P. Thawatsupha, M. Chittaganpit, R. Khontong, J.M. Simmerman, & S. Chunsuthiwat. 2005. Probable person-to-person transmission of avian influenza A (H5N1). *N. Engl. J. Med.* 352:333-340.
 102. Vey, M., M. Orlich, S. Adler, H.D. Klenk, R. Rott, & W. Garten. 1992. Haemagglutinin activation of pathogenic avian influenza viruses of serotype H7 requires the recognition motif R-X-R/K-R. *Virology* 188:408-413.
 103. Vigerust, D. J. & V.L. Shepherd. 2007. Virus glycosylation: role in virulence and immune interactions. *Trends in Microbiol.* 15:211-218.
 104. Vigerust, D. J., K. B. Ulett, K. L. Boyd, J. Madsen, S. Hawgood, & J.A. McCullers. 2007. N-Linked glycosylation attenuates H3N2 influenza viruses. *J. Virol.* 81: 8593-8600.
 105. Vines, A., K. Wells, M. Matrosovich, M.R. Castrucci, T. Ito, & T. Kawaoka. 1998. The role of influenza A virus haemagglutinin residues 226 and 228 in receptor specificity and host range restriction. *J. Virol.* 72:7626-7631.
 106. Wagner, R., D. Heuer, T. Wolff, A. Herwig & H.-D. Klenk. 2002. N-Glycans attached to the stem domain of haemagglutinin efficiently regulate influenza A virus replication. *J. Gen. Virol.* 83:601-609.

107. Wagner, R., M. Matrosovich, & H.D. Klenk. 2002. Functional balance between haemagglutinin and neuraminidase in influenza virus infections. *Rev. Med. Virol.* 12: 159–166.
108. Wagner, R., R. Wagner, T. Wolff, A. Herwig, S. Pleschka, & H.-D. Klenk. 2000. Interdependence of hemagglutinin glycosylation and neuraminidase as regulators of influenza virus growth: a study by reverse genetics. *J. Virol.* 74: 6316–6323.
109. Wang, C., K. Takeuchi, L.H. Pinto, & R.A. Lamb. 1993. Ion channel activity of influenza A virus M2 protein: characterization of the amantadine block. *J. Virol.* 67:5585–5594.
110. Ward, C.W., J. M. Murray, C.M. Roxburgh, & D.C. Jackson. 1983. Chemical and antigenic characterization of the carbohydrate side chains of an Asian (N2) influenza virus neuraminidase. *Virology* 126:370-375.
111. Webster, R.G. 2002. The importance of animal influenza for human disease. *Vaccine* 20:316–320.
112. Webster, R.G. 2004. Wet markets: a continuing source of severe acute respiratory syndrome and influenza?. *Lancet* 363 (9404):234-236.
113. Webster, R.G., & D.J. Hulse. 2004. Microbial adaptation and change: avian influenza. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 23:453-465.
114. Webster, R.G., & E.A. Govorkova. 2006. H5N1 influenza continuing evolution and spread. *N. Engl. J. Med.* 355:2174–2177.
115. Weis, W., J.H. Brown, S. Cusack, J.C. Paulson, J.J. Skehel, & D.C. Wiley. 1988. Structure of the influenza virus haemagglutinin complexed with its receptor sialic acid. *Nature* 333:426–431.
116. Whitesides, G.M., M. Mammen, & G. Dahmann. 1995. Effective inhibitors of hemagglutination by influenza virus synthesized from polymers having active ester groups. Insight into mechanism of inhibition. *J. Med. Chem.* 38: 4179–4190.
117. Wiley, D.C., & J.J. Skehel. 1987. The structure and function of the hemagglutinin membrane glycoprotein of influenza virus. *Ann. Rev. Biochem.* 56:365–394.
118. Wiley, D.C., I. A. Wilson, & J. J. Skehel. 1981. Structural identification of the antibody-binding sites of Hong Kong influenza hemagglutinin and their involvement in antigenic variation. *Nature* 289:373–378.
119. Wood, G.W., J.W. McCauley, J.B. Bashiruddin, & D.J. Alexander. 1993. Deduced amino acid sequences at the haemagglutinin cleavage site of avian influenza A viruses of H5 and H7 subtypes. *Arch. Virol.* 130:209–217.
120. Yamada, S., Y. Suzuki, T. Suzuki, M.Q. Le, C.A. Nidom, Y. Sakai-Tagawa, Y. Muramoto, M. Ito, M. Kiso, T. Horimoto, K. Shinya, T. Sawada, M. Kiso, T. Usui, T. Murata, Y. Lin, A. Hay, L.F. Haire, D. J. Stevens, R.J. Russell, S.J. Gamblin, J.J. Skehel, & Y. Kawaoka. 2006. Haemagglutinin mutations responsible for the binding of H5N1 influenza A viruses to human-type receptors. *Nature* 444: 378-382.

Correspondencia:

Gabriela Ramos-Clamont Montfort
 Centro de Investigación en Alimentación
 y Desarrollo A.C.
 Coordinación de Ciencia de los Alimentos.
 Carretera a la Victoria Km. 0.6.
 Hermosillo, Sonora. 35000.
 Tel. y fax (662) 280-00-58.
 gramos@ciad.mx