



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**Análisis bioinformático de las
proteínas HN y F del virus de la
parotiditis y su relación con la
clasificación basada en el gen SH**

T E S I S

QUE COMO UNO DE LOS REQUISITOS
PARA OBTENER EL GRADO DE:
**MAESTRA EN CIENCIAS
QUIMICOBIOLOGICAS**

P R E S E N T A

QBP RUBICELA HERNÁNDEZ ROBLES

Directores:

Dra. Blanca Lilia Barrón Romero

Dr. Alfonso Méndez Tenorio



México, D.F.

2010

**El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Virología del
Departamento del Microbiología de la Escuela Nacional de
Ciencias Biológicas bajo la dirección de la Dra. Blanca Lilia
Barrón Romero y del Dr. Alfonso Méndez Tenorio.**

Índice

	Página
RELACIÓN DE FIGURAS	v
RELACIÓN DE TABLAS	vi
ABREVIATURAS	vii
RESUMEN	ix
ABSTRACT	x
INTRODUCCIÓN	1
I. Clasificación y estructura del MuV	1
II. Patogénesis de la parotiditis	4
III. Prevención contra el MuV	7
IV. Clasificación genética del MuV	9
V. El resurgimiento del MuV	11
VI. Las glicoproteínas de superficie del MuV	14
La hemaglutinina-neuraminidasa	14
La glicoproteína de fusión	18
JUSTIFICACIÓN	21
OBJETIVO GENERAL	22
OBJETIVOS PARTICULARES	22
METODOLOGÍA	23
I. Esquema general de trabajo	23
II. Compilación de datos	24
III. Procesamiento de secuencias	24
IV. Análisis de mutaciones	24
V. Predicción <i>in silico</i> de la estructura secundaria	25
VI. Predicción <i>in silico</i> de la estructura terciaria	26
VII. Ubicación de mutaciones significativas en los modelos teóricos	26
RESULTADOS	27
I. Compilación de datos	27
II. Procesamiento de datos	28
Alineamiento múltiple de secuencias y construcción de dendrogramas	29
III. Identificación de mutaciones en las proteínas HN y F	33
IV. Predicción <i>in silico</i> de la estructura secundaria de las proteínas HN y F	41
V. Predicción <i>in silico</i> de la estructura terciaria	44

Predicción de la proteína HN del MuV	45
Validación de la estructura de la proteína HN del MuV obtenida <i>in silico</i>	48
Predicción <i>in silico</i> de la estructura terciaria de la proteína F del MuV	51
Validación de la estructura teórica de la proteína F del MuV	54
VI. Ubicación de las mutaciones en las estructuras predichas de las proteínas HN y F del MuV	56
DISCUSIÓN	62
COCLUSIONES	70
PERSPECTIVAS	71
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72
APÉNDICE	81

RELACIÓN DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Micrografías electrónicas de viriones del MuV	2
Figura 2. Esquema del genoma del MuV	2
Figura 3. Estructura de un virión de parotiditis	4
Figura 4. Fotografía de un niño con parotiditis	5
Figura 6. Árbol filogenético del MuV mostrando los 13 genotipos actualmente identificados	10
Figura 7. Secuencia de la proteína HN del MuV	15
Figura 8. Estructura tridimensional de un monómero de la HN del SV5	16
Figura 9. Secuencia de la proteína F del MuV mostrando las regiones importantes	19
Figura 10. Estructura tridimensional de la proteína F del SV5	20
Figura 11. Dendrograma obtenido a partir de los alineamientos de las secuencias de aminoácidos de la proteína SH del MuV	30
Figura 12. Dendrograma obtenido a partir de los alineamientos de las secuencias de aminoácidos de la proteína HN del MuV	31
Figura 13. Dendrograma obtenido a partir de los alineamientos de las secuencias de aminoácidos de la proteína F del MuV	32
Figura 14. Estructura secundaria de la proteína HN del MuV (cepa Miyahara), obtenida con PSIPRED	42
Figura 15. Estructura secundaria de la proteína F del MuV (cepa Miyahara), obtenida con PSIPRED	43
Figura 16. Alineamiento de las secuencias de las proteínas HN del SV5 y HN del MuV	46
Figura 17. Gráfica de los potenciales DOPE para cada aminoácido de la proteína HN del MuV obtenida <i>in silico</i> y de la proteína HN del SV5	47
Figura 18. Gráfica de Ramachandran obtenida con PROCHECK para la proteína HN del MuV	50
Figura 19. Estructura tridimensional de la proteína HN del MuV obtenida <i>in silico</i> con MODELLER9v7	51
Figura 20. Gráfica de los potenciales DOPE para cada aminoácido de la proteína F del MuV obtenida <i>in silico</i> y de la proteína F del SV5	53
Figura 21. Gráfica de Ramachandran obtenida con PROCHECK para la proteína F del MuV	55
Figura 22. Estructura tridimensional de la proteína F del MuV obtenida <i>in silico</i> con MODELLER9v7	57
Figura 23. Diagramas en esferas de la proteína HN del MuV mostrando las mutaciones identificadas en regiones importantes en diferentes genotipos	58
Figura 25. Diagramas en esferas de la proteína F del MuV mostrando las mutaciones identificadas en regiones importantes en diferentes genotipos	59

RELACIÓN DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Complicaciones debidas a una infección con el MuV	6
Tabla 2. Cepas vacunales del MuV actualmente utilizadas	8
Tabla 3. Distribución geográfica de los genotipos del virus de la parotiditis	12
Tabla 4. Aminoácidos funcionales de la hemaglutinina-neuraminidasa del MuV	17
Tabla 5. Número de secuencias de los genes HN, F y SH identificadas de acuerdo al genotipo SH	27
Tabla 6. Mutaciones encontradas en las secuencias de la proteína HN de MuV agrupadas por genotipos	34
Tabla 7. Mutaciones encontradas en las secuencias de la proteína HN de MuV agrupadas por genotipos	34
Tabla 8. Número de mutaciones importantes encontradas en las secuencias de las proteínas HN y F del MuV agrupadas por genotipo.	35
Tabla 9. Mutaciones encontradas en las secuencias de las proteínas HN de diversas cepas del MuV agrupadas por genotipos	37
Tabla 10. Mutaciones encontradas en las secuencias de las proteínas F de diversas cepas del MuV agrupadas por genotipos	39
Tabla 11. Valores de la función objetivo de los modelos de la proteína HN del MuV generados por MODELLER9v7	46
Tabla 12. Resultados de la gráfica de Ramachandran obtenida con PROCHECK para la estructura teórica de la proteína HN del MuV	49
Tabla 13. Resultados obtenidos con DaliLite para la validación con base a parámetros estereoquímicos de la estructura teórica de la proteína HN del MuV	50
Tabla 14. Valores de la función objetivo de los modelos de la proteína HN del MuV generados por MODELLER9Vv7	53
Tabla 15. Resultados de la gráfica de Ramachandran obtenida con PROCHECK para la estructura teórica de la proteína F del MuV	54
Tabla 16. Resultados obtenidos con DaliLite para la validación con base a parámetros estereoquímicos de la estructura teórica de la proteína F del MuV	56
Tabla 17. Cambios de energía libre de Gibbs producidos por las mutaciones identificadas en regiones importantes de la proteína HN del MuV	60
Tabla 18. Cambios de energía libre de Gibbs producidos por las mutaciones identificadas en regiones importantes de la proteína F del MuV	61

ABREVIATURAS

A.- alanina
C.- cisteína
D.- ácido aspártico
DAMBE.- Data analysis in molecular biology and evolution.
DOPE.- Energía Optimizada Directa de la Proteína
E... ácido glutámico
EBI.- European Bioinformatics Institute
EMBL.- European Molecular Biology Laboratory
EPH.- Enlace por puente de hidrógeno
F.- fenilalanina
F.- proteína de fusión
G.- glicina
H.- histidina
HeV.- Virus Hendra
HN.- hemaglutinina neuraminidasa
hPIV-3.- virus de parainfluenza-3 humano
HR1.- hepta repetido 1
HR2.- .hepta repetido 2
hRSV.- virus sincicial respiratorio humano, “human respiratory syncytial virus”
I.- isoelucina
INF.- interferón
JN.- método Neighbor-Joining
K.- lisina
L.- polimerasa
L.- leucina
M.- metionina
M.- proteína de matriz
MeV.- Virus del sarampión, “measles virus”
MMR.- vacuna triple viral: sarampión, paperas y rubiola.
MuV.- Virus de la parotiditis, “mumps virus”
N.- asparagina
N.- Nucleoproteína
NCBI.- “National Center for Biotechnology Information”
NVD.- Virus de la enfermedad de Newcastle
NiV.- Virus Nipah
Nm.- nanómetros
Nt.- nucleótido
OMS.- Organización Mundial de la Salud
P.- prolina
P.- fosfoproteína
PDB.- “Protein Data Bank”
PIV-5.- virus de parainfluenza-5
PSIPRED.- “Protein Structure Prediction Server”
Q.- glutamina

R.- arginina
RMSD.- desviación de la medida cuadrática, “Root Mean Square Deviation”
RNA.- ácido ribonucleico
RNP.- ribonucleocapside
S.- serina
SH.- proteína hidrofóbica pequeña
SNC.- sistema nervioso central
ssRNA (-).- RNA de cadena sencilla de polaridad negativa
SV5.- virus del simio 5
T.- treonina
TNF- α .- factor de necrosis tumoral α
UTRs.- regiones no traducidas
V.- valina
W.- triptófano
Y.- tirosina
 Δ GG.- Energía libre de Gibbs

RESUMEN

El virus de la parotiditis (mumps virus, MuV) pertenece a la familia *Paramixoviridae*, género *Rubulavirus*. Este virus es el agente causal de la parotiditis, enfermedad caracterizada por la inflamación de las glándulas parótidas que se presenta comúnmente en la niñez. Sin embargo, también puede provocar complicaciones a nivel de sistema nervioso central como meningitis y encefalitis en adolescentes y adultos.

Se considera que el MuV es serológicamente monotípico, pero con base a la secuencia del gen que codifica para la proteína hidrofóbica pequeña (SH), existen 13 genotipos diferentes (nombrados de A a M), con una distribución mundial variable. Aunque el uso masivo de vacunas ha reducido exitosamente la infección con MuV, los brotes con este virus no se han eliminado completamente, aún en poblaciones con altos índices de vacunación. Esto se ha atribuido a la incapacidad de las vacunas para neutralizar virus de genotipos heterólogos.

Las propiedades antigénicas y de virulencia del MuV se deben a las glicoproteínas HN y F; HN está relacionada con la unión al receptor celular (ácido siálico) y contiene los epítomos para la generación de anticuerpos neutralizantes; mientras que la proteína F es el principal determinante de neurovirulencia y realiza la fusión de las membranas viral y celular, al ser activada por HN.

La clasificación molecular basada en el gen SH de las cepas del MuV es importante para la epidemiología de estas infecciones, pero no es informativa con respecto a las propiedades antigénicas y de neurovirulencia de estos virus, que como ya se mencionó, están dadas por las proteínas HN y F, razón por la cual en este trabajo se realizó un análisis a través de herramientas bioinformáticas para determinar si existe alguna relación entre la clasificación genética del virus y las propiedades biológicas de las proteínas antes mencionadas.

Para el propósito anterior, se obtuvieron las secuencias de los genes SH, HN y F del MuV depositadas en el GenBank y con el apoyo de la literatura se les asignó el genotipo dado por el gen SH. Las secuencias de genes se tradujeron a aminoácidos. Se hicieron alineamientos y a partir de estos se construyeron dendrogramas para cada proteína, esto con la finalidad de observar si el agrupamiento de las secuencias de las proteínas HN y F corresponden a la clasificación dada por el gen SH. Por otro lado, se generaron alineamientos a partir de las secuencias nucleótidos y de aminoácidos de cada proteína agrupadas por genotipos y en estos se identificaron mutaciones que pudieran provocar algún cambio en zonas importantes de las proteínas los que se ubicaron en la estructura tridimensional de las proteínas HN y F predichas *in silico*.

El agrupamiento obtenido en los dendrogramas de las proteínas HN y F, no correspondió totalmente a la clasificación basada en el gen SH. Las mutaciones identificadas en las proteínas HN y F del virus, podrían afectar a sus propiedades antigénicas y de neurovirulencia. En el caso de la HN, solo se presentaron en los genotipos A, B, C y D; y en el caso de la proteína F, los cambios se presentaron en cepas de genotipo A, B, C, D, G y K. Es importante señalar que las cepas del MuV utilizadas como cepas vacunales únicamente son de genotipos A y B, por lo que la identificación de cambios en estos genotipos sugiere que estas cepas no son las más idóneas para generar una respuesta inmune protectora contra todos los genotipos.

ABSTRACT

Mumps virus (MuV) belongs to the *Papillomaviridae* family, *Rubulavirus* genus, and it is the causal agent of mumps infection, a disease characterized by inflammation of the parotid glands, commonly occurring in childhood. However, the virus may cause complications in the central nervous system such as meningitis and encephalitis in teenagers and adults.

MuV is considered as monotypic strain, but according to small hydrophobic protein (SH) gene sequence there are 13 different genotypes (named from A to M), which are distributed worldwide. Although massive vaccination has successfully reduced the incidence of MuV infection, mumps outbreaks had not been completely eradicated, even in high frequency vaccinated populations. This phenomenon has been attributed to the vaccines lack to neutralize heterologous genotype strains.

HN and F proteins are responsible for MuV antigenicity and virulence properties; HN is associated to cell receptor (sialic acid) and contains the epytopes to generate neutralizing antibodies; while F is the main neurovirulence determinant and induces the fusion of viral membrane to cellular membrane when it is activated by HN.

MuV molecular classification based on the SH gene is important for epidemiological research of these infections but it is not informative in relation to viral antigenic and neurovirulence properties, which are related to the HN and F proteins. In order to this research was to determine whether there is a relationship between the genotypic classification and the biological properties already mentioned. The F gene sequences were obtained from GenBank database and the SH genotype was assigned to each one of them, according to scientific publications. Nucleotide sequences were translated into proteins sequences. The alignments were done with the aa sequences and dendograms where built to analyze whether the HN and F groups corresponded to the SH classification. On the other hand, mutations that may cause an important change into *in silico* predicted HN and F tridimensional structures where identified.

It was found that the dendogram pattern of HN and F proteins did not fully correspond to SH classification. Several mutations were identified in HN and F proteins which could affect their antigenic and neurovirulence properties. HN mutations where only found in A, B, C, and D genotypes; and in the F protein, mutations where detected in A, B, C, D, G and K genotypes. It is important to point out that MuV vaccine strains actually used correspond only to A and B genotypes, and therefore the mutations found in these genotypes may explained the waek immune response generated against all genotypes.

INTRODUCCIÓN

La parotiditis, comúnmente conocida como “paperas”, es una infección causada por el virus de la parotiditis (“mumps virus”, MuV) que está caracterizada por la inflamación de las glándulas parótidas y se presenta comúnmente en la niñez (Hviid *et al.*, 2008).

I. Clasificación y estructura del MuV.

El MuV es un miembro de la familia *Paramyxoviridae*, de la subfamilia *Paramixivirinae* y del género *Rubulavirus*. Comparte algunas características con virus de importancia médica como el del sarampión (MeV) y el sincicial respiratorio humano (hRSV), virus recientemente identificados como Hendra (HeV) y Nipah (NiV) que causan enfermedades mortales y virus que infectan a animales, por ejemplo, el de la enfermedad de Newcastle (NDV) (Carbone *et al.*, 2007).

Estos viriones son estructuras pleomórficas envueltas que miden de 100 a 600 nm de diámetro y muestran una nucleocápside helicoidal. La envoltura lipídica proviene de la célula hospedera y presenta proyecciones formadas por las glicoproteínas virales que se extienden de 12 a 15 nm desde la superficie del virión (fig. 1) (Carbone *et al.*, 2007).

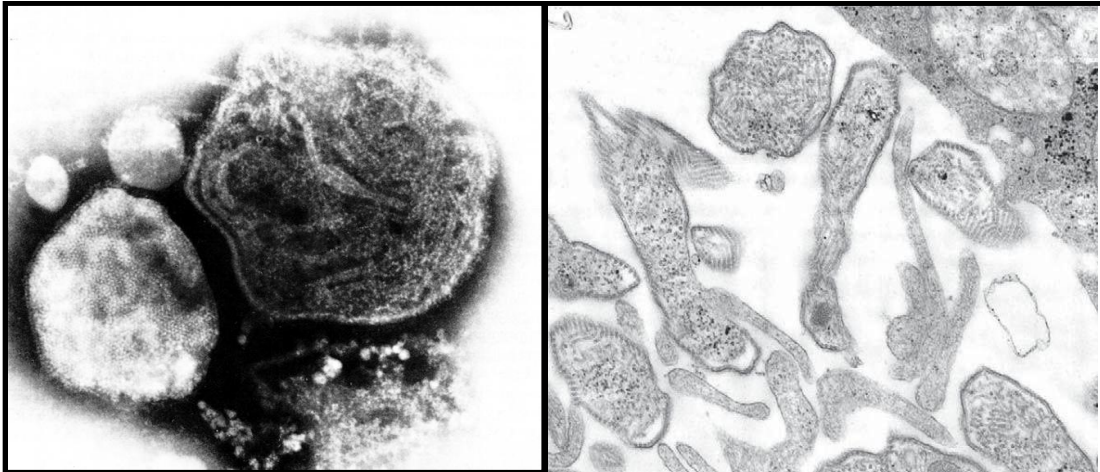


Figura 1. Micrografías electrónicas de viriones del MuV (tomado de Huppertz *et al.*, 1977, Hviid *et al.*, 2008).

El RNA genómico es una macromolécula no segmentada, de cadena sencilla con polaridad negativa que consiste de 15,384 nucleótidos y contiene siete genes que codifican para la proteína asociada a la nucleocápside o nucleoproteína (N), la fosfoproteína (P), las proteínas Ve I, la proteína de matriz (M), la proteína de fusión (F), la proteína hidrofóbica pequeña (SH), la hemaglutinina-neuraminidasa (HN) y la polimerasa (L). El orden de los genes es 3'-N-P-M-F-SH-HN-L-5' (Carbone *et al.*, 2007) (fig. 2). Cada gen codifica una sola proteína, con excepción del segundo que codifica para tres, P, V e I (Paterson *et al.*, 1990). Las unidades de transcripción están flanqueadas por regiones 3' y 5' no traducidas (UTRs) separadas por secuencias intergénicas con un tamaño de 1 a 7 nt (Carbone *et al.*, 2007).



Figura 2. Esquema del genoma del MuV. ssRNA (-) lineal con 15,384 nt. 7 genes que codifican para 9 proteínas (tomado y modificado de <http://expasy.org/viralzone/>).

Los viriones del MuV consisten de un núcleo con una ribonucleocápside helicoidal interior (RNP) rodeada por una envoltura que se deriva de la membrana de la célula hospedera. La RNP está formada por el RNA viral encapsidado por la proteína N y asociada con las proteínas L y P (que funcionan como RNA polimerasa y transcriptasa, respectivamente) para formar el complejo de transcripción y replicación viral.

Las proteínas V e I se encuentran en el interior del virión, son codificadas por el gen P y se sintetizan como resultado de la edición co-transcripcional del RNA mensajero (Elliot *et al.*, 1990, Paterson *et al.*, 1990). La proteína V evita la respuesta antiviral mediada por el interferón (INF) bloqueando la señalización de éste y limitando su producción (Kubota *et al.*, 2001). Hasta el momento no se conoce la función de la proteína I.

La proteína M (asociada a la membrana), se encuentra entre la nucleocápside y la membrana viral, participa en el ensamble del virión y en la liberación de las partículas virales de la superficie celular (Carbone *et al.*, 2007).

En la envoltura viral se ubican la proteína SH que bloquea la apoptosis (Wilson *et al.*, 2006) y las glicoproteínas HN y F, las cuales son responsables de los procesos de reconocimiento al receptor celular (ácido siálico) y de la fusión de la membrana del virión con la membrana de la célula huésped, respectivamente. La proteína HN también exhibe actividad de neuraminidasa, permitiendo la liberación de la superficie celular de los viriones nacientes y la prevención de la autoagregación viral (fig. 3).

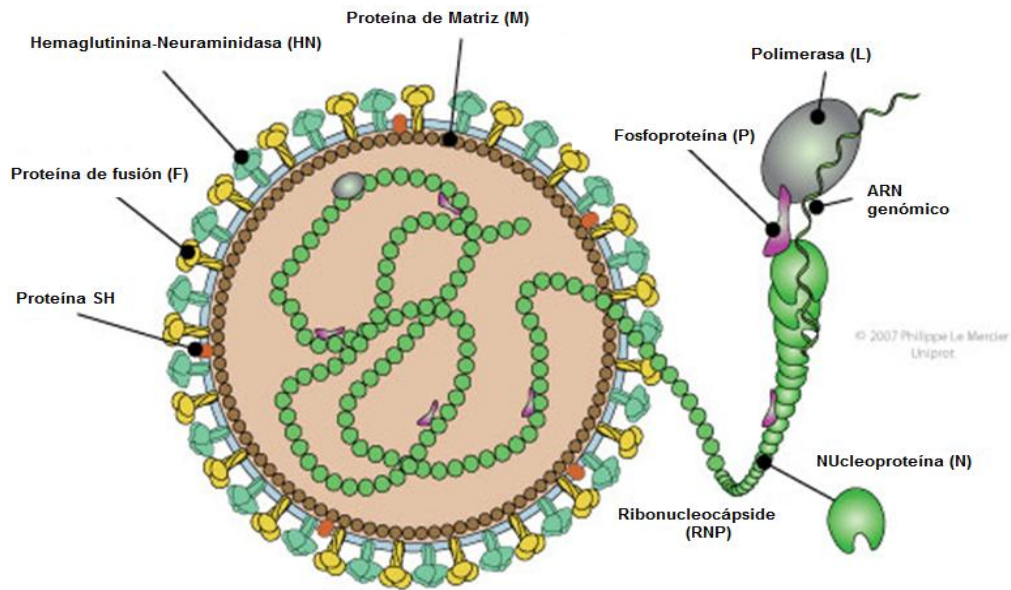


Figura. 3. Estructura de un virión de parotiditis (tomado y modificado de <http://expasy.org/viralzone/>).

II. Patogénesis de la parotiditis

La infección con el MuV va de moderada a altamente contagiosa y está restringida a los humanos (Hviid *et al.*, 2008). Este virus se disemina a través de gotas de saliva de personas infectadas, por contacto directo o por fómites contaminados; se replica en la faringe y presenta un periodo de incubación de 18 a 21 días que puede extenderse hasta 35 días. Durante este tiempo el virus se multiplica en las vías respiratorias altas, se propaga hacia los nódulos linfáticos y se disemina a otros órganos como sistema nervioso central (SNC), gónadas, riñones, páncreas, corazón y articulaciones, a través de una viremia plasmática. Después del periodo de incubación, se presenta la etapa aguda de la infección donde aparecen los primeros síntomas y signos característicos de la enfermedad (Hviid *et al.*, 2008).

La infección con el MuV resulta en una enfermedad aguda con síntomas que incluyen fiebre, dolor de cabeza y mialgia, seguida por la inflamación de las glándulas salivales, de las cuales, las glándulas parótidas (localizadas dentro de las mejillas, cerca de la mandíbula y debajo de las orejas) son las áreas afectadas con mayor frecuencia (fig.4) (Boddicker *et al.*, 2007). La inflamación de estas glándulas progresa entre 2 y 3 días y persiste cerca de una semana (Carbone *et al.*, 2007). Aunque la parotiditis es considerada como una enfermedad poco severa, autolimitante de la niñez, también puede ocurrir en adolescentes y adultos (Jin *et al.*, 2004).



Figura 4. Fotografía de un niño con parotiditis. Se muestra la inflamación característica de las glándulas parótidas (tomado de <http://www.cdc.gov/mumps/about/photos.html>)

Una de las complicaciones más frecuentes de esta infección se presenta a nivel del SNC, desarrollándose meningitis aséptica, que ocurre en más del 10 % de los individuos, incluyendo niños y adultos (Jin *et al.*, 2004; Wilson *et al.*, 2006). Esta enfermedad se

caracteriza por un repentino aumento de fiebre con síntomas clínicos como dolor de cabeza, vómito, rigidez del cuello y letargia (Hviid *et al.*, 2008), evidenciados por cambios en el líquido cefalorraquídeo que incluyen pleocitosis y ausencia de bacterias. El tratamiento es sintomático y la mayoría de los pacientes se recuperan en una semana (Bonnet *et al.*, 2006). En el SNC también se puede desarrollar encefalitis aguda y crónica, mielitis transversa, hidrocefalia y ataxia cerebelar aguda (Palacios *et al.*, 2000). Otras complicaciones de la infección son orquitis, mastitis, ooforitis, pancreatitis, nefritis, deterioro del oído y aborto en el primer trimestre (Bonnet *et al.*, 2006; Boddicker *et al.*, 2007; Carbone *et al.*, 2007) (tabla 1). Con poca frecuencia el MuV se ha asociado con artropatía y miocarditis.

Tabla 1. Complicaciones debidas a una infección con el MuV.

Complicación	% casos
Parotiditis	95% de pacientes con síntomas clínicos
Epididimo-orquitis	15-30% de hombres adultos con infección
Orquitis bilateral	15-30% de casos con epidídimo orquitis
Ooforitis	5% de mujeres adultas con infección
Meningitis	1-10% de infecciones
Encefalitis	0-1% de infecciones
Muerte	1-5% de casos de encefalitis
Sordera unilateral permanente	0.005% de infecciones
Aborto espontáneo	27% de mujeres embarazadas en el primer trimestre después de la infección con MuV
Pancreatitis	4% de infecciones

*Tomado de Hviid *et al.*, 2008.

Aunque el índice de casos fatales es solo de 1 en 10,000, las complicaciones no fatales por la infección de MuV a menudo terminan en hospitalización pero sin secuelas neurológicas severas o permanentes (Palacios *et al.*, 2000).

III. Prevención contra el MuV

La parotiditis es una enfermedad prevenible mediante la utilización de vacunas, las cuales están disponibles desde 1960. Actualmente 114 países incluyen a la vacuna contra el MuV en sus programas de inmunización (fig. 5) (http://www.who.int/immunization_monitoring/diseases/mumps/en/index.html).

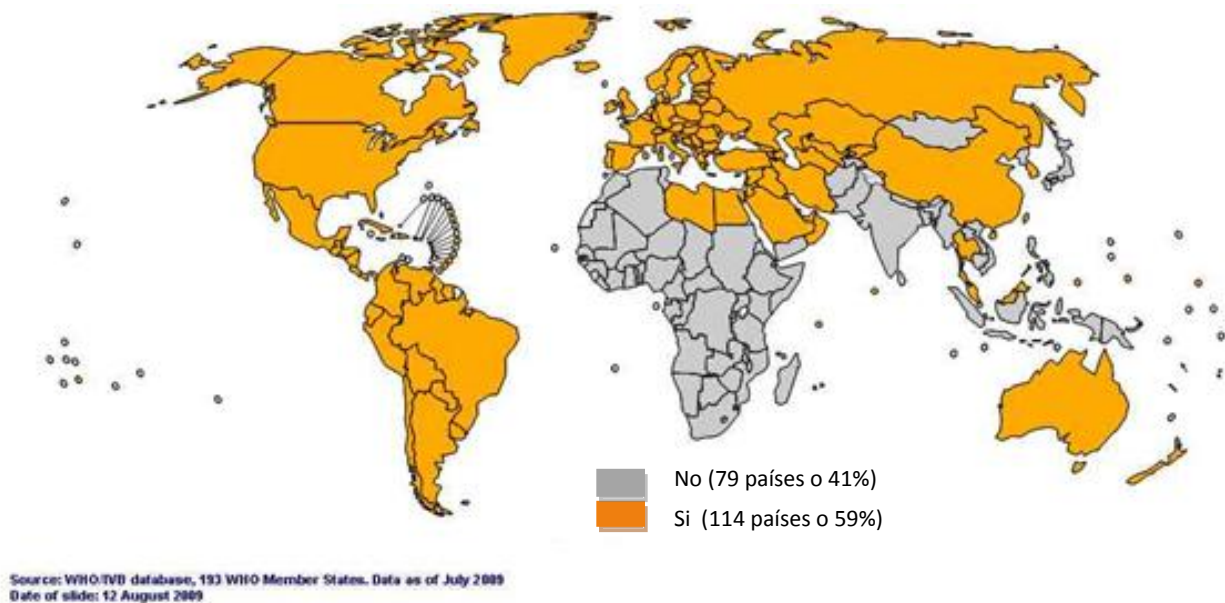


Figura 5. Esquema que muestra los países que utilizan la vacuna contra el MuV en sus programas de inmunización (tomado de http://www.who.int/immunization_monitoring/diseases/mumps/en/index.html)

Todas las vacunas disponibles contra el MuV contienen virus atenuados, pueden ser monovalentes, pero usualmente se administran en combinación con las vacunas contra el sarampión y la rubeola (MMR) (<http://www.who.int/immunization/policy/mumps.pdf>). Se puede inmunizar con una dosis, sin embargo, la Organización Mundial de la Salud (OMS)

recomienda la administración de una primera dosis entre los 12 y 15 meses de edad y una segunda entre los 4 y 6 años, para una mejor protección.

Se considera que el MuV es serológicamente monotípico, lo que significa que una vacuna con cualquiera de las cepas de este virus es capaz de proveer protección durante toda la vida contra una infección subsecuente (Nojd *et al.*, 2001; Reid *et al.*, 2008; Atrasheuskaya *et al.*, 2007).

Actualmente se utilizan 11 cepas vacunales del MuV en el mundo (tabla 2), de las cuales la Jeryl Lynn y la UrabeAm9 son las más utilizadas, seguidas de la Leningrado-Zagreb y Leningrado-3 (Hviid *et al.*, 2008).

Tabla 2. Cepas vacunales del MuV actualmente utilizadas

Cepa	Fabricante	Genotipo	Principal área de distribución
Jeryl Lynn	Merck	A	Mundial
RIT 4385 ^a	GlaxoSmithKline	A	Mundial
Urabe	Sanofi Pasteur Biken	B	Mundial Japón
Hoshino	Kitasato Institute	B	Japón
Rubini	Swiss Serun Institute	A	Europa
Leningrado-3	Bacterial Medicine Institute, Moscow		Rusia
Leningrado-Zagreb	Institute of Immunology of Zagreb Serum Institute of India	Na	Yugoslavia Mundial
Miyahara	Chem-Sero Therapeutic Research Institute	B	Japón
Torii	Takeda Chemicals	Na	Japón
NK M-46	Chiba	Na	Japón
S-12	Razi State Serum and Vaccine Institute	Na	Iran

*Tomado y modificado de Bonnet *et al.*, 2006.

IV. Clasificación genética del MuV

El gen SH del MuV tiene un tamaño de 316 nucleótidos y codifica para la proteína hidrofóbica pequeña (SH). Esta es una proteína integral de membrana que consta de 57 aminoácidos y que participa en el bloqueo de la apoptosis a través de la inhibición de la señalización del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) (Wilson *et al.*, 2006).

El gen SH es la región más heterogénea del genoma del MuV, por lo que la secuencia de nucleótidos de este gen se ha utilizado en estudios de epidemiología molecular para agrupar las cepas virales a nivel mundial (Santos *et al.*, 2008, Uchida *et al.*, 2001).

El análisis filogenético del MuV basado en la secuencia de nucleótidos del gen SH ha permitido la identificación de 13 grupos, referidos como genotipos, designados de la A a la M (fig. 6). El último genotipo se identificó en el año 2008 en São Paulo, Brasil (Santos *et al.*, 2008).

En el año 2001, Uchida *et al.*, de Japón y Teclé *et al.*, de Suecia, propusieron dos cepas diferentes como nuevo genotipo (genotipo J) al mismo tiempo, esto se debió a la falta de acuerdos con respecto a los criterios para designar un nuevo genotipo a una cepa viral. Para evitar este tipo de controversias, Jin *et al.*, en el 2005 propuso que para establecer un nuevo grupo, se deben utilizar los 316 nucleótidos del gen SH y debe haber una variación mayor al 5% al comparar la secuencia del nuevo genotipo con las secuencias de genotipos ya existentes. La variación de nucleótidos entre genotipos iguales se encuentra entre el 2% y 4% y la variación entre todos los genotipos oscila entre el 5% y 19% (Jin *et al.*, 2005; Johansson *et al.*, 2002).

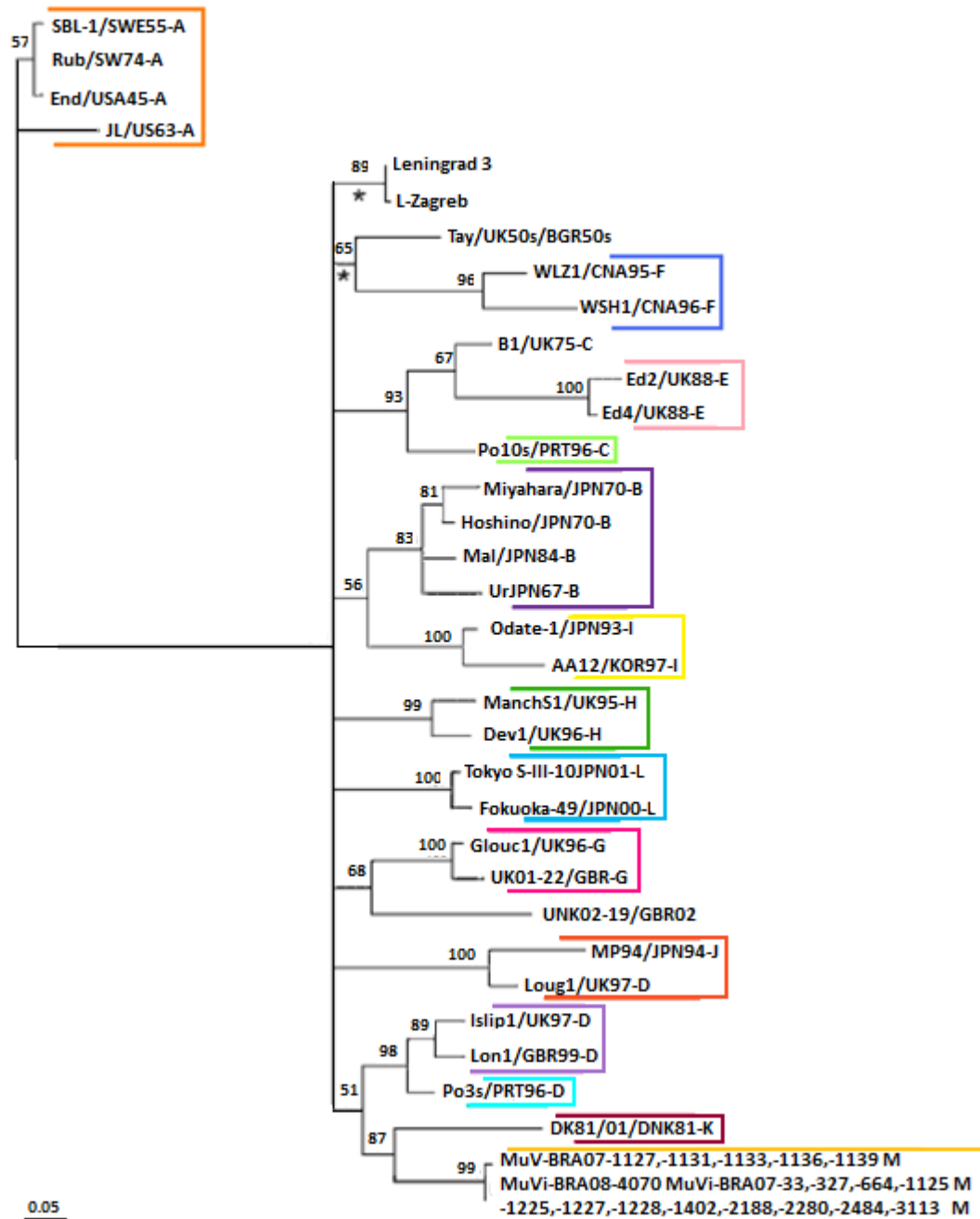


Figura 6. Árbol filogenético del MuV mostrando los 13 genotipos actualmente identificados. Análisis basado en la secuencia del gen SH utilizando el modelo evolutivo k8iuf y el método de máxima probabilidad. Reconstrucción con PAUP. Valores de bootstrap con 100 replicas (Santos *et al.*, 2008).

La distribución geográfica de los genotipos del MuV es variable. En el hemisferio occidental predominan los genotipos C, D, E, G y H y en Asia, los genotipos B, F e I. Varios genotipos pueden circular simultáneamente en una región y pueden existir cambios en su distribución (Hviid *et al.*, 2008), por ejemplo, en el Reino Unido, el genotipo predominante C ha cambiado a una mezcla de genotipos C, D, H y G en co-circulación (tabla 3). A la fecha no se conocen los factores que influyen en la distribución de los genotipos (Hviid *et al.*, 2008).

V. El resurgimiento del MuV

Durante mucho tiempo, se prestó poca atención a los temas relacionados con la parotiditis, sin embargo, la ocurrencia de brotes del MuV en poblaciones vacunadas, han abierto un nuevo interés en este virus (Atrasheuskaya *et al.*, 2007a,b; Hviid *et al.*, 2008). En la tabla 3 se presentan los casos de parotiditis que han ocurrido en países que incluyen a la vacuna contra este virus en sus programas de inmunización y que han realizado la genotipificación de las cepas virales responsables de los brotes.

Como se observa, existe un gran número de reportes de casos de parotiditis en poblaciones con altos índices de vacunación. La reinfección con el MuV ahora es considerada como un problema de salud pública mundial (Santos *et al.*, 2008).

Usualmente los brotes de parotiditis son atribuidos a focos de individuos no vacunados o a los fracasos primarios (carencia de seroconversión) o secundarios (disminución de inmunidad) de las vacunas (Bonnet *et al.*, 2006). Sin embargo, el hecho de que las cepas vacunales del MuV solo pertenezcan a dos genotipos (A y B) (tabla 2) y que la mayoría de los brotes se han asociado a cepas de virus con genotipos distintos a los de las vacunas

(tabla 3), ha dado lugar a reconsiderar la capacidad de neutralización cruzada entre los diferentes genotipos del virus.

Tabla 3. Distribución geográfica de los genotipos del virus de la parotiditis, así como el número de casos reportados por la OMS entre los años 1999-2008.

País	Genotipo	No. de casos entre 1999-2008	Referencia
Canadá	C, H, G	2313	Afzal <i>et al.</i> , 1997; OMS
China	F	1,354,523	Wu <i>et al.</i> , 1998, OMS
Dinamarca	C, D, H, J	131	Teclé <i>et al.</i> , 2001; OMS
Francia	C, D	59,647	Afzal <i>et al.</i> , 1997. WHO
Alemania	A, C, D	15***	Afzal <i>et al.</i> , 1997.
Japón	A, B, G, J, H, I, K, L	955,566*	Afzal <i>et al.</i> , 1997; Örvell <i>et al.</i> , 1997; Takahashi <i>et al.</i> , 2000; Uchida <i>et al.</i> , 2001; Lee <i>et al.</i> , 2003; Kashiwagi <i>et al.</i> , 1999; Inou <i>et al.</i> , 2004. OMS
República de Corea	J, I	21,261	Kim <i>et al.</i> , 2000, Lee <i>et al.</i> , 2003.
Lituania	C, D	5970	Teclé <i>et al.</i> , 2002; OMS
Portugal	C, D	10,922	Afzal <i>et al.</i> , 1997; OMS
Singapur	B	20,162	Lim <i>et al.</i> , 2003; OMS
Suecia	A, C, D	351	Örvell <i>et al.</i> , 1997; Teclé <i>et al.</i> , 1998; OMS
Suiza	A, C, H, G	4068+	Künkel <i>et al.</i> , 1994; Ströhle <i>et al.</i> , 1996; Utz <i>et al.</i> , 2004; OMS
Reino de Gran Bretaña	C, D, E, G, H, F, J, K	86,912*	Jin <i>et al.</i> , 1999; Afzal <i>et al.</i> , 1997, Örvell <i>et al.</i> , 1997; OMS
Estados Unidos	A, D, H, G	8847**	Afzal <i>et al.</i> , 1997; Cohen <i>et al.</i> , 1999; Amexis <i>et al.</i> , 2002; Watson-Creed <i>et al.</i> , 2006; OMS
Rusia	C, H	165,746*	Atrasheuskaya <i>et al.</i> , 2007a,b.OMS
España	H, G, A, C, D, J	43008	Boga <i>et al.</i> , 2008; Echevarría <i>et al.</i> , 2010; OMS
Italia	H	92,691	Alirezaie <i>et al.</i> , 2008. Gabutti, <i>et al.</i> , 2008; OMS
Brasil	M	56****	Santos <i>et al.</i> , 2008.
Irlanda	G, J	3515	Reid <i>et al.</i> , 2008; OMS
Países Bajos	G	105++	Brockhoff <i>et al.</i> , 2010.
Croacia	G	1105	Santk <i>et al.</i> , 2006; OMS
Israel	NA	253	Huerta <i>et al.</i> . 2006; OMS
Jordania	NA	54,399	Batayneh y Bdour, 2002; OMS
México	NA	98,677	OMS

NA. Países que no han realizado la genotipificación del MuV.

*Con algunos casos de meningitis aséptica. **Meningitis y otras complicaciones. *** casos estudiados entre 1974-1993.

****Casos reportados en 1997, 2000, 2006-2007. + Casos en 2007-2008. ++Casos reportados solo en el 2004.

Observaciones de laboratorio sugieren que la neutralización cruzada entre diferentes cepas es limitada y varios estudios justifican la necesidad de la clasificación del MuV en diferentes serotipos. Análisis realizados en Novosibirsk, Rusia, apoyan la hipótesis de que un suero con anticuerpos neutralizantes contra una cepa del MuV tiene una capacidad limitada para neutralizar cepas de virus heterólogas, anticuerpos de pacientes que fueron vacunados con la cepa Leningrado-Zagreb no neutralizaron virus con genotipos C y H, sugiriendo que las diferencias antigénicas entre las cepas vacunales del MuV y las cepas tipo silvestre que se encuentran circulando, pueden ser importantes en las infecciones en la población vacunada (Atrasheuskaya *et al.*, 2007b). Así mismo, en Suecia se realizaron estudios *in vitro* que demostraron que los anticuerpos neutralizantes contra el MuV no protegen contra la infección de un genotipo de MuV heterólogo, anticuerpos de genotipo D no protegen contra una infección con virus de genotipo A, (Nöjd *et al.*, 2001). La reacción cruzada parcial también se observó entre virus de genotipos A de las cepas Jeryl Lynn y SBL-1 (Örvell *et al.*, 2002). Aunado a esto, se han observado diferencias antigénicas entre cepas con genotipo A y cepas con genotipos B-D y G-I, datos que correlacionan con la distancia filogenética entre estos genotipos.

La evolución continua y la redistribución de los genotipos del MuV teóricamente puede permitir la aparición de cepas con una neurovirulencia aumentada o reducir la neutralización cruzada con cepas vacunales. Los estudios epidemiológicos han permitido encontrar una asociación entre distintas cepas, genotipos o grupos de genotipos con el incremento de la neurovirulencia. Por ejemplo, cepas del MuV pertenecientes a los genotipos C, D, H o J se asociaron a padecimientos en el SNC (Tecele *et al.*, 1998, 2001). Virus con genotipos C y D que circularon en Suecia fueron más neuropatógenos que la

cepa SBL-1 de genotipo A (Tecele *et al.*, 1998). También se encontró una asociación de la cepa Odate-1 aislada en Japón (genotipo I) con enfermedad en el SNC (Saito *et al.*, 1996).

Los análisis anteriores sumados a los casos de reinfección apuntan hacia la existencia de anticuerpos de neutralización genotipo-específicos.

VI. Las glicoproteínas de superficie del MuV

La hemaglutinina-neuraminidasa

La glicoproteína HN del MuV es una proteína transmembranal de tipo II. Es una lectina de unión específica al ácido siálico que reconoce glicoconjugados moleculares como receptores para que el virus se una a la superficie de la membrana de la célula hospedera. Esta propiedad de unión al ácido siálico le confiere las actividades de hemaglutinación y de hemadsorción. La glicoproteína también actúa como neuraminidasa, removiendo el ácido siálico de la progenie viral para prevenir la auto-agregación, favoreciendo la liberación de los viriones de la célula. En adición, la HN activa a la proteína F, participando así en la internalización de partículas virales a través de la fusión de la membrana celular y la membrana viral (Carbone *et al.*, 2007).

El gen HN tiene un tamaño de 1,749 nt y la proteína consta de 582 aminoácidos. Los primeros 34 aminoácidos forman el dominio citoplásmico. El dominio de anclaje a la membrana o dominio transmembranal se encuentra entre los residuos 35 y 55. El dominio extracelular se localiza entre los residuos 56 a 582, abarcando una región de 526 residuos. Dado que no existen datos obtenidos experimentalmente de la estructura tridimensional de la proteína HN, estos datos solo se consideran como potenciales (fig. 7) (Jain *et al.*, 2009).

10	20	30	40	50	60	70
MEPSKLF TMS	DNATFAPGPV	INAADKKTFR	TCFRILVLSV	QAVILILVIV	ILGELV RMIN	DQGLSNQLSS
80	90	100	110	120	130	140
IADKIRE SAT	MIASAVGVVN	QVIHGVTVSL	PLQIEGNQNO	LLSTLAT ICT	GKKQVSN CST	NIPLVNDLRF
150	160	170	180	190	200	210
INGINKF IIE	DYATHDFSIG	HPLNMPSFIP	TATSPNGCTR	IPSFSLGKTH	WCYTHNVINA	NCKDHTSSNQ
200	230	240	250	260	270	280
YISMGILVQT	ASGYPMFKIL	KIQYLSDG LN	RKSCSIATVP	DGCAMCYVVS	TQLETDDYAG	SSPPTQKLT L
290	300	310	320	330	340	350
LFYNDIVTER	TISPTGLEGN	WATLVPGVGS	GIYFENKLIF	PAYGGVLPNS	SLGVKSAREF	FRFVNPNYPC
360	370	380	390	400	410	420
SGPQQDL DQR	ALRSYFPSYF	SNRRVQS AFL	VCAWNQILVT	NCELVVPSNN	QILMGA EGRV	LLINNRLLYY
430	440	450	460	470	480	490
QRSTSWW PYE	LLYEISFTFT	NSGQSSVNMS	WIPIYSFTRP	GSGNCSGENV	CPTACVSGVY	LDPWPLTPYS
500	510	520	530	540	550	560
HQSGINRNFY	FTGALLNSST	TRVNP TLYVS	ALNNLKV LAP	YGNQGLFASY	ITITCFQDTG	DASVYCVYIM
570	580					
ELASNIVGEF	QILPVLTRLT	IT				

Figura 7. Secuencia de la proteína HN del MuV mostrando los dominios potenciales: citoplásmico (amarillo), transmembranal (verde) y topológico (rosa) (Jain *et al.* 2009).

Existen modelos tridimensionales de las proteínas HN de otros virus que también pertenecen a la familia *Paramixoviridae*, entre los cuales están el virus de parainfluenza-5 o virus del simio 5 (PIV-5 ó SV5, rubulavirus) (Yuan *et al.*, 2005), el virus de la enfermedad de Newcastle (NDV, abulavirus) (Crennell *et al.*, 2000) y el virus de parainfluenza-3 (hPIV-3, respirovirus) (Lawrence *et al.*, 2004). Estas proteínas cristalizadas se han utilizado como modelos para los estudios la proteína HN del MuV.

Se ha determinado que en estado nativo, la proteína HN presenta una estructura de barril cuyo sitio activo se encuentra en la región central. Esta proteína es un tetrámero formado por dos dímeros unidos por puentes disulfuro. Cada monómero exhibe un tallo proximal a la membrana viral que soporta la cabeza globular, formando una estructura de propela de 6 láminas β (Carbone *et al.*, 2007). La cabeza globular de HN es multifuncional, siendo responsable de la unión al receptor y de la actividad de neuraminidasa y en conjunto con la glicoproteína de fusión, media la fusión virus-célula y célula-célula.

Recientemente se encontró un segundo sitio de unión para el ácido siálico en el NDV que involucra a los aminoácidos G169 y R516 (Zaitsev *et al.*, 2004), estos residuos

corresponden a los aminoácidos P175 y P530 en la HN del MuV, debido a las diferencias físicoquímicas de estos aminoácidos, es improbable que el segundo sitio de unión sea funcional en el MuV, como es el caso de la HN del SV5, que también posee prolina como residuo equivalente y no presenta un segundo sitio de unión al ácido siálico (Yuan *et al.*, 2005). Los probables sitios activos de la HN del MuV se presentan en la tabla 4.

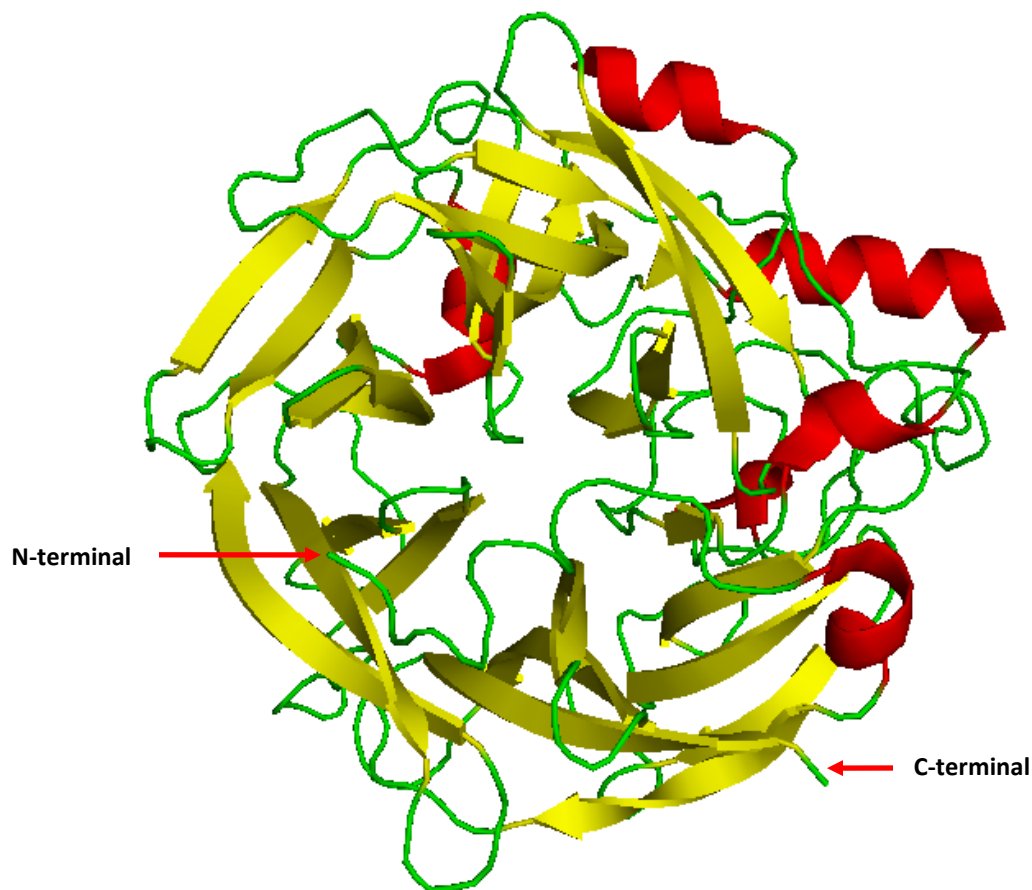


Figura 8. Estructura tridimensional de un monómero de la HN del SV5. Se observan la estructura de propela con 6 láminas β (rosa) con 6 hélices α (azul) (Yuan *et al.*, 2005)

Tabla 4. Aminoácidos funcionales de la hemaglutinina-neuraminidasa del MuV

Actividad	MuV	SV5	NDV	PIV-3
Principal sitio de unión al receptor	M 226 K 228 L 230 E 407 R 422 Y 540	F 209 R 211 L 213 E 390 R 405 Y 523	F 220 S 222 L 224 E 401 R 416 Y 526	D 238 N 240 R 242 E 421 R 436 Y 554
Segundo sitio de unión al receptor	P 162 P 175 P 530 Y 531 N 533 I 566 V 567 V 575	P 144 P 158 Q 513 F 514 S 516 L 549 L 550 F 558	F 156 G 169 R 516 V 517 S 519 L 552 F 553 L 561	L 174 V 187 A 544 I 545 N 547 S 580 L 581 F 589
Neuraminidasa	R 180 D 204 E 407 R 422 R 512 Y 540 E 561	R 163 D 187 E 390 R 405 R 495 Y 523 E 544	R 174 D 198 E 401 R 416 R 498 Y 526 E 547	R 192 D 216 E 409 R 424 R 503 Y 530 E 549
Promoción de la fusión	S 222 M 226 K 228 L 230 V 567 Q 571	A 205 F 209 R 211 L 213 L 550 Q 554	T 216 F 220 S 222 L 224 F 553 R 557	D 234 D 238 N 240 R 242 L 581 Q 585
Unión a Ca ⁺²	D 268 G 270 S 272 A 302	D 250 S 253 A 255 A 285	D 261 S 264 V 266 V 296	D 279 S 282 G 284 A 316

La primera columna presenta la función asociada con cada uno de los residuos. Las columnas siguientes presentan los residuos de aminoácidos (código de una letra y posición) del MuV (cepa Urabe AM9), virus del simio 5 (SV5), virus de la enfermedad de Newcastle (NDV) y virus de parainfluenza-3 (PIV-3). Las filas muestran los residuos en posiciones equivalentes. Los residuos conservados entre diferentes cepas del mismo virus están en negritas. (tomado de Santos *et al.*, 2009)

La proteína HN contiene nueve sitios potenciales de N-glicosilación (N-X-T o N-X-S) localizados en “loops”, en los residuos de aminoácidos 12-14, 127-129, 284-286, 329-331, 400-402, 448-450, 464-466, 507-509, 514-516 (Yates *et al.*, 1996). Los sitios de glicosilación en la proteína HN son importantes en el mantenimiento de la estructura y propiedades antigénicas del dominio extracelular (Crennell *et al.*, 2000). Se ha observado

que cambios en estos sitios alteran la conformación de la proteína afectando la virulencia y la afinidad por los receptores celulares (Rubin *et al.*, 2003).

Además de las actividades de reconocimiento del receptor celular, de neuraminidasa y de la promoción de la fusión, la proteína HN del MuV es el principal blanco para la respuesta inmune humoral e induce la producción de anticuerpos neutralizantes. Los epítomos para la neutralización con anticuerpos se localizan en las regiones de aminoácidos 265-288, 329-340 y 352-360 (Örvell *et al.*, 1997b; Cusi *et al.*, 2001; Kövamees *et al.*, 1990, respectivamente)

La glicoproteína de fusión

La proteína de fusión (F) del MuV es una proteína de fusión viral clase I. Esta proteína media la fusión de la membrana viral con la membrana celular para la entrada del virus a la célula y es el principal determinante de neurovirulencia del MuV (Lemon *et al.*, 2007).

Durante el proceso de fusión de membranas, la proteína HN al unirse al receptor celular (ácido siálico) induce un cambio conformacional en la proteína F para disparar la cascada de fusión (Tanabayashi *et al.*, 1992; Dutch *et al.*, 1999). F no es activada por el pH ácido del endosoma, sino por la proteína HN.

El gen F que codifica para la proteína de fusión y posee 1,617 nt. La proteína F está formada por 538 aminoácidos. Esta proteína es sintetizada como un precursor inactivo, F₀, que posteriormente experimenta un proceso de glicosilación en el retículo endoplásmico de la célula hospedera. El precursor glicosilado es transportado al aparato de Golgi en donde sufre un corte proteolítico entre los aminoácidos 102 y 103 en el motivo R-R-H-K-R (residuos 98-102) para producir un fragmento largo en el extremo carboxilo terminal (F₁) y

un fragmento más corto en el extremo amino terminal (F₂), unidos por un enlace disulfuro (Waxham *et al.*, 1987, Elango *et al.*, 1989). El corte de F₀ es esencial para la actividad de fusión de la membrana viral con la membrana celular (fig. 9).

Los primeros 19 aminoácidos del extremo N-terminal de la subunidad F₁ comprenden el péptido de fusión, un dominio hidrofóbico conservado expuesto por el evento de corte (Elango *et al.*, 1989; Tecele *et al.*, 2000). Los residuos 483-512 de la proteína constituyen el dominio de anclaje a la membrana. En el segmento F2 existen 2 sitios potenciales de N-glicosilación (N-X-T) en las posiciones 73-75 y 89-91 y en el segmento F₁ se presentan cinco sitios potenciales de N-glicosilación (N-X-T y N-X-S) en los residuos 182-184, 352-354, 427-429, 433-435, 433-435 y 457-459 (Elango *et al.*, 1989).

10	20	30	40	50	60	70
MKVFLVTC	LGFAV	FSSSV	CVNINI	LQQIGY	IKQV	RQLSY
YSQSSSS	YIV	VKLLP	NIQPT	DNSCE	FKSV	T
80	90	100	110	120	130	140
QYNK	TL	SNLL	LPIA	ENINNI	ASPS	SGSR
RRH	RF	FAGIA	IGI	AALG	VATA	AQ
VTA	AVS	L	VQA	QTN	ARA	IAAM
150	160	170	180	190	200	210
KNSIQ	ATN	RAV	FEV	KE	GT	QR
LAI	AV	QAI	QD	HINT	IM	NTQL
NNM	SCQI	LDN	QLAT	SLGL	YL	TELT
TV	FP	Q	220	230	240	250
LIN	PAL	SPI	S	I	QAL	RS
LLGS	MTP	AV	Q	ATL	ST	SIS
AEIL	SAG	L	MEG	QIV	SV	LL
DEM	MI	VKIN	IP	IVT	290	300
310	320	330	340	350	360	370
QSN	AL	VID	FY	SISS	FIN	NOE
SII	QL	P	D	RIL	EIG	NE
Q	WS	YP	AKN	CKL	TR	RH
IF	Q	Y	NE	A	E	R
LS	LE	SK	L	CL	LA	420
430	440	450	460	470	480	490
GNIS	AC	V	F	S	I	A
RR	F	V	ALD	G	T	I
V	ANC	RSL	T	CL	CK	SP
SY	PI	Y	Q	P	D	H
AV	T	T	I	D	L	T
AC	Q	T	L	S	D	G
L	D	G	L	D	F	490
500	510	520	530			
SIV	S	L	S	N	I	T
Y	A	E	N	L	T	I
S	L	S	Q	T	I	N
T	I	N	T	Q	P	I
D	I	S	T	E	L	S
K	V	N	A	S	L	Q
N	A	V	K	Y	I	K
E	S	N	H	Q	L	S
V	N	V	N	S	K	I
G	A	I	V	A	490	
500	510	520	530			
L	V	L	S	I	L	S
I	I	I	S	L	L	F
C	C	W	A	Y	A	T
K	E	I	R	R	I	N
F	K	T	N	H	I	N
T	S	S	V	D	D	L
L	I	R	Y			

Figura 9. Secuencia de la proteína F del MuV mostrando las regiones importantes. Péptido señal (residuos 1-19, amarillo), F₀ (residuos 20-538), F₂ (residuos 20-102, verde), F₁ (residuos 103-538, sin color). Dominio extracelular* (residuos 20-486), dominio transmembranal** (residuos 487-507, azul), dominio citoplásmico* (residuos 508-538, morado), péptido de fusión* (residuos 103-127, rosa), estructura “coiled-coil”*** (residuos 128-156 y 452-477, letras amarillas). Sitio de corte por el hospedero* (residuos 102 y 103, rojo) (Jain *et al.*, 2009)

*Por similitud **Potencial

Al menos dos dominios hidrofóbicos de hepta repetidos (HR) se encuentran en la subunidad F₁, HR1 que se encuentra en el extremo N-terminal, adyacente al péptido de

fusión y HR2 localizado en el extremo C-terminal al lado del dominio transmembranal. Los análisis bioquímicos y físicoquímicos sugieren que los dominios HR1 y HR2 de la proteína F del MuV interactúan para formar una estructura estable de propela de 6 hojas (Carbone *et al.*, 2007). HR2 probablemente está involucrada en la unión de la proteína F con la HN. Se han identificado dominios adicionales en otros paramixovirus, sin embargo esto no se han confirmado en el MuV.

Como sucede con la proteína HN, la proteína F del MuV no se ha cristalizado, sin embargo, se cuenta con la estructura cristalizada de la proteína F del SV5 que es un rubulavirus (Yin *et al.*, 2006). Esta proteína es un trímero que contiene una cabeza globular unida a un tallo con estructura de “coiled-coil” en el extremo carboxilo terminal (fig. 10).

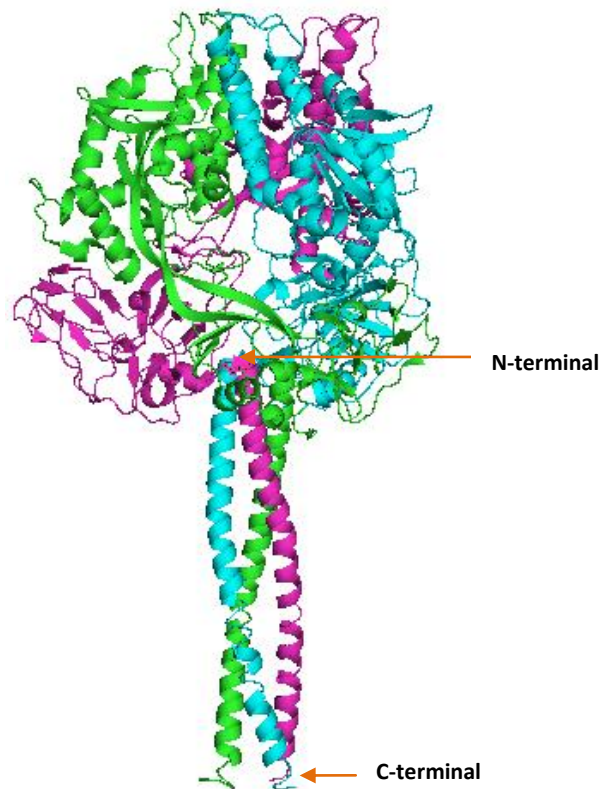


Figura 10. Estructura tridimensional de la proteína F del SV5. Se muestra el trímero con la cabeza globular unida a un tallo con estructura de “coiled-coil”. Cadena A (verde), cadena B (azul), cadena C (rosa) (Yin *et al.*, 2006)

JUSTIFICACIÓN

La clasificación molecular del MuV basada en el gen SH es importante para la epidemiología de estos virus, pero no es informativa con respecto a sus propiedades antigénicas y de neurovirulencia, las cuales están dadas por las proteínas HN y F.

Debido a que no se ha establecido si existe una relación entre los genotipos identificados del MuV con las propiedades biológicas, proporcionadas por las proteínas HN y F, en este proyecto se realizó un análisis de las variaciones que se pueden encontrar en estas proteínas para determinar si estos cambios se ven reflejados en los genotipos SH.

OBJETIVO GENERAL

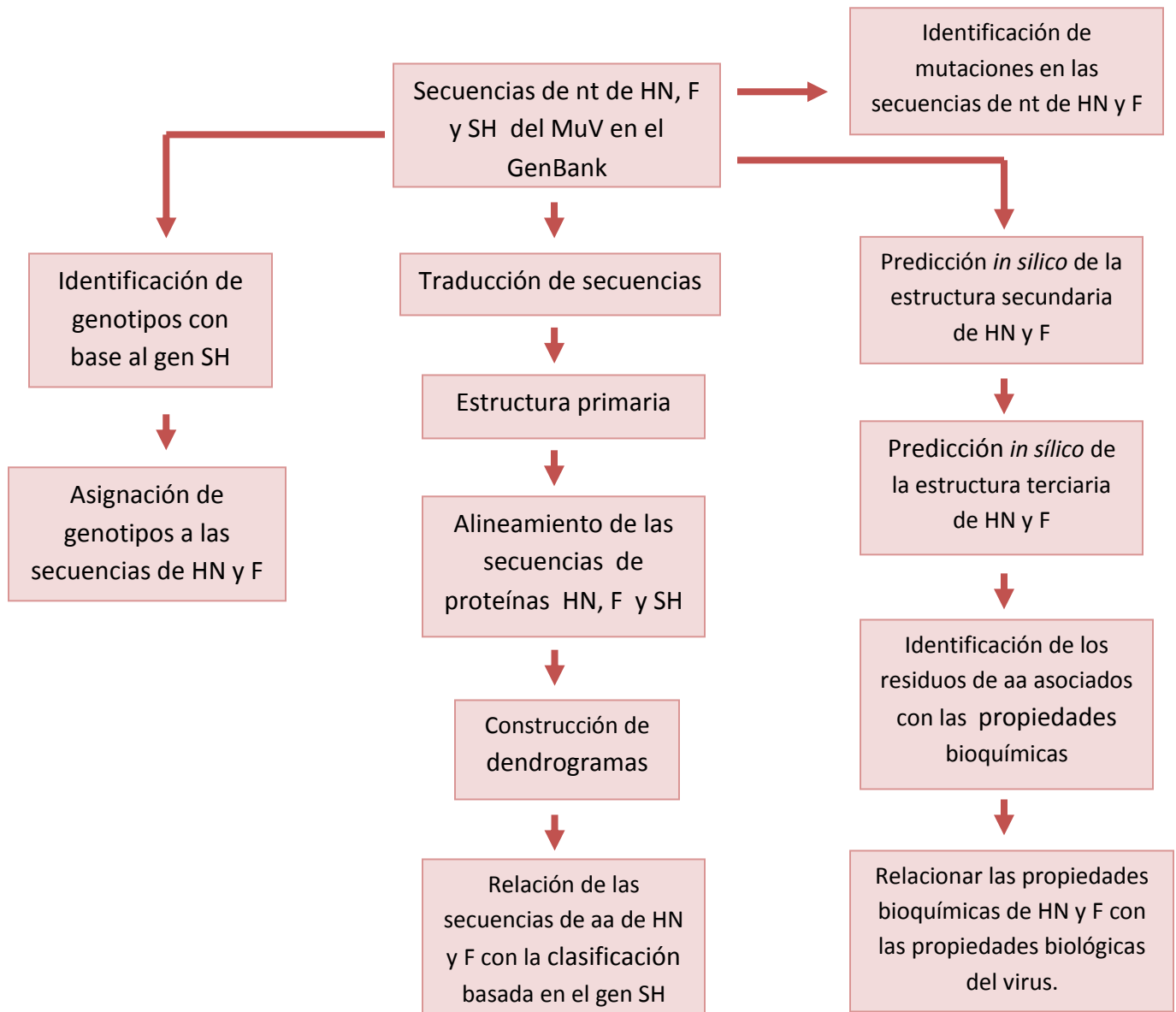
Relacionar las propiedades biológicas de las proteínas HN y F de los virus de la parotiditis (MuV) con la clasificación genética basada en el gen SH.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Analizar las secuencias de aminoácidos de las proteínas HN y F de las diversas cepas del virus de la parotiditis (MuV), con respecto a la clasificación basada en el gen SH.
- Predecir *in silico* la estructura secundaria y terciaria de las proteínas HN y F.
- Identificar y comparar los residuos de aminoácidos de las proteínas HN y F que están asociados a las propiedades biológicas y ubicarlos en la estructura terciaria de dichas proteínas.
- Dilucidar el posible impacto de las variaciones en la estructura y las propiedades biológicas de las proteínas HN y F y su asociación con la genotipificación por SH.

MÉTODOLÓGÍA

I. ESQUEMA GENERAL DE TRABAJO



II. Compilación de datos

Se obtuvieron las secuencias de nucleótidos de las regiones codificantes de los genes SH, HN y F del MuV disponibles en el GenBank (Benson *et al.*, 2006). La determinación del genotipo para cada secuencia del gen SH se realizó a través de la consulta en la literatura científica. A cada secuencia de los genes HN y F, se le asignó el genotipo SH correspondiente a la cepa de procedencia.

III. Procesamiento de secuencias

La traducción de secuencias de nucleótidos de las regiones codificantes a aminoácidos de los genes HN y F se llevó a cabo con el editor de secuencias BioEdit 7.0.0 (Ibis Therapeutics), utilizando el código genético estándar.

El alineamiento múltiple de las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos se realizó con el programa MUSCLE (Edgar, 2004) (EBI-EMBL). Para el cálculo de distancias se utilizó la distancia-p. Para la construcción de los dendrogramas, mediante el criterio de distancias, se utilizó el programa MEGA 4.0 (Tamura *et al.*, 2007), a través del algoritmo Neighbor-Joining (Saitou *et al.*, 1987).

IV. Análisis de mutaciones

Para el análisis de mutaciones, las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos de las proteínas HN y F se agruparon por genotipos. Cada grupo de secuencias se alineó utilizando el programa MUSCLE (Edgar, 2004). Para facilitar la identificación de los

cambios, los alineamientos se visualizaron con el editor de secuencias GeneDoc (Nicholas *et al.*, 1997). Posteriormente se procedió a la identificación manual de los cambios utilizando tanto las secuencias de nucleótidos como las de aminoácidos. Solo se tomaron en cuenta las mutaciones con sentido no sinónimas, es decir, aquellos cambios en los nucleótidos que generan la sustitución de un aminoácido por otro.

Se emplearon algunos criterios para seleccionar mutaciones significativas o de importancia, es decir, los cambios de aminoácidos que pudieran afectar a la integridad de la estructura y en consecuencia a las propiedades biológicas de las proteínas en estudio, estos criterios fueron: a)cambio de aminoácidos de acuerdo a la hidrofobicidad, b)capacidad para donar o aceptar puentes de hidrógeno, c)cambios de cualquier aminoácido por prolina o viceversa, d)cambios de cualquier aminoácido por glicina o viceversa, e)cambios de cualquier aminoácido por un aminoácido aromático y viceversa (Martin *et al.*, 2002).

V. Predicción *in silico* de la estructura secundaria

La predicción de la estructura secundaria de las proteínas HN y F del MuV se realizó a través del servidor PSIPRED v3.0 (Bryson *et al.*, 2005). Este análisis se hizo para las proteínas pertenecientes a la cepa Miyahara (No. de acceso en el GenBank NC_002200), cepa de referencia del MuV en el GenBank (Benson *et al.*, 2006).

VI. Predicción *in silico* de la estructura terciaria

Las estructuras tridimensionales de las proteínas HN y F del MuV se predijeron utilizando el método de modelación por homología con el programa MODELLER 9v7 (Sali y Blundell, 1993), utilizando como templados a las proteínas cristalizadas HN y F del virus de la parainfluenza 5 (PIV5), también llamado virus símico 5 (SV5) con números de acceso en el Protein Data Bank (PDB) 1Z4Z para la proteína HN y 2B9B para la proteína F (<http://www.pdb.org/pdb/home/home.do>).

La calidad estereoquímica de las estructuras obtenidas se evaluó mediante la construcción de las gráficas de Ramachandran a través de MODELLER 9v7 (Sali y Blundell, 1993) y la validación se realizó con el programa PROCHECK (Laskowski *et al*, 1993) y con DaliLite (Holm y Park, 2000).

La visualización de los modelos obtenidos se llevó a cabo con el software PyMOL(TM) (Delano, 2006).

VII. Ubicación de mutaciones significativas en los modelos teóricos

Los cambios de aminoácidos que se encontraron en las secuencias de las proteínas agrupadas por genotipos y que se seleccionaron como importantes, se ubicaron en las estructuras tridimensionales de los modelos obtenidos para las proteínas HN y F del MuV utilizando el programa PyMOL (DeLano, 2008).

RESULTADOS

I. Compilación de datos

Se llevó a cabo la búsqueda de las secuencias de nucleótidos de las regiones codificantes de los genes SH, HN y F del MuV en el GenBank (Benson *et al.*, 2006). Se obtuvieron un total de 746 secuencias de nucleótidos, de las cuales 572 correspondieron al gen SH, 95 al gen HN y 79 al gen F. Dado que mayoría de las secuencias obtenidas carecieron de anotaciones con respecto al genotipo, se recurrió a la literatura científica para averiguar el genotipo correspondiente de cada secuencia.

Se logró asignar el genotipo a 516 secuencias del gen SH, a 85 del gen HN y a 75 del gen F. Únicamente 70 secuencias no se lograron clasificar. En la tabla 5 se presenta el número de secuencias identificadas para cada genotipo.

Tabla 5. Número de secuencias de los genes HN, F y SH identificadas de acuerdo al genotipo SH.

Genotipo SH	HN	F	SH
A	16	13	20
B	32	22	36
C	8	9	60
D	5	6	60
E	0	0	3
F	2	2	22
G	3	12	162
H	5	4	48
I	10	2	25
J	0	0	51
K	1	2	4
L	0	0	3
M	0	0	18
Leningrado-Zagreb	3	3	5
Total	85	75	516
Total Identificadas	666		
Total sin Clasificar	70		

En el apéndice se encuentra una tabla que contiene los números de acceso de todas las secuencias de genes obtenidos en el GenBank (Benson *et al.*, 2006), así como su genotipo y la referencia bibliográfica.

II. Procesamiento de datos

Antes de iniciar el análisis, se editaron los títulos de las secuencias de los genes SH, HN y F, escribiendo el número de acceso en el GenBank (Benson *et al.*, 2006) seguido por el genotipo y por el nombre de la cepa.

Como en un primer alineamiento de las secuencias de nucleótidos de los genes SH y HN se observaron grupos de secuencias exactamente iguales, se decidió tomar una secuencia representativa de cada grupo por genotipo con la intención de facilitar la visualización de los resultados, en especial para los dendrogramas, para esto, se requirió del apoyo del software DAMBE (Xia *et al.*, 2001), programa que identifica y separa rápidamente secuencias repetidas. Las secuencias con un tamaño menor al de la región traducida (174 nt) se eliminaron del análisis para evitar su interferencia en los resultados. Las secuencias cuyo genotipo no se logró asignar fueron excluidas del análisis, con excepción de las Leningrado-Zagreb, ya que es conocido que estas secuencias no tienen genotipo (Ivancic *et al.*, 2005). En total, se utilizaron 254 secuencias para el gen SH, 93 del gen HN y 75 secuencias del gen F.

Una vez que se eligieron las secuencias con las que se trabajaría, se llevó a cabo la traducción de estas por medio del editor de secuencias BioEdit (Ibis Therapeutics).

Alineamiento múltiple de secuencias y construcción de dendrogramas

Las secuencias de los genes y de las proteínas HN, F y SH se alinearon con programación dinámica utilizando MUSCLE (Edgar, 2004). Los alineamientos de las secuencias de aminoácidos se utilizaron para la construcción de dendrogramas para las proteínas SH, HN y F. En las figuras 11, 12 y 13 se muestran los dendrogramas obtenidos con base a un análisis de distancia-p con el algoritmo Neighbor Joining (Saitou *et al.*, 1987). La distancia-p es el número de diferencias observadas entre dos secuencias, dividida entre la longitud del alineamiento; por este motivo, el empleo de esta medida de distancia permitió el agrupamiento de las secuencias de acuerdo al número de diferencias entre ellas.

La construcción del dendrograma con las secuencias de las proteínas SH se realizó para comprobar que éste era capaz de distinguir a los genotipos del MuV de misma manera que los análisis comúnmente utilizados para la genotipificación de dicho virus, los cuales están basados en el gen SH y que en su mayoría utilizan el algoritmo Neighbor-Joining y Kimura de 2 parámetros como modelo evolutivo (Jin *et al.*, 2005). De manera general se observó en el dendrograma correspondiente a este análisis (fig. 11) la formación de grupos de secuencias de proteínas bien definidos de acuerdo al genotipo determinado con base al gen SH (cada genotipo está representado por un color). Se observaron pocas discrepancias con respecto al arreglo de algunas secuencias. Las que pertenecen al genotipo K, se separaron en diferentes grupos de genotipos (entre J y D, principalmente) y las de genotipo D formaron dos grupos. Sin tomar en cuenta las secuencias con genotipos K y D, este análisis se pudo aplicar para observar si el agrupamiento de las secuencias de las proteínas HN y F corresponde al genotipo dado por SH.

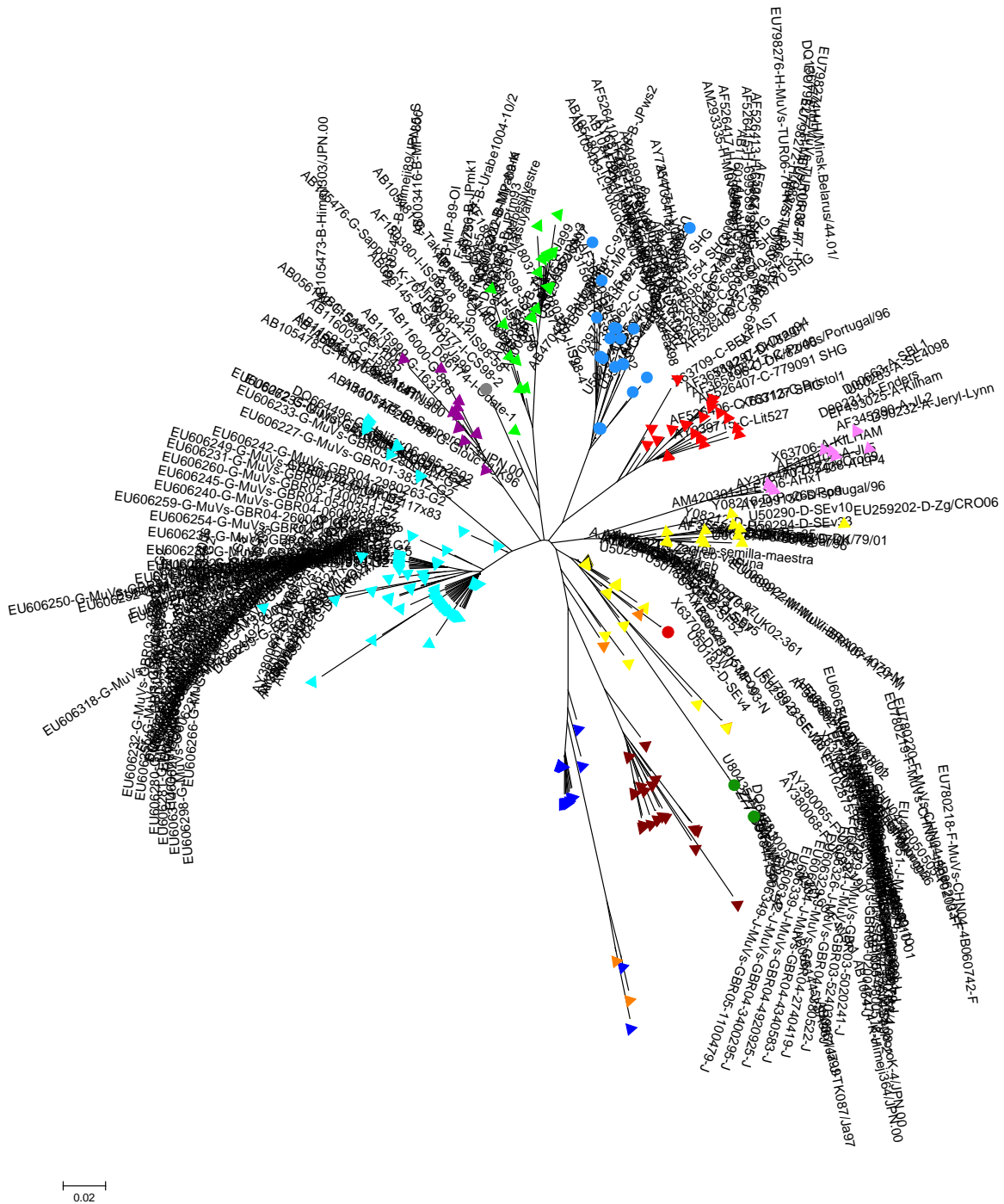


Figura 11. Dendrograma obtenido a partir de los alineamientos de las secuencias de aminoácidos de la proteína SH del MuV. Las diferencias se calcularon a través del método de distancia p, para el agrupamiento se utilizó el algoritmo NJ. Los colores representan los diferentes genotipos SH: ▲ A ● B ▲ C ▲ D ● E ▲ F ▲ G ▲ H ▲ I ▲ J ▲ K ● L ● M ▲ LN. Se utilizaron 254 secuencias cuyos nombres fueron editados (dejando solo el genotipo correspondiente, seguido de un número ascendente) para una mejor visualización. Los nombres de las secuencias que se utilizaron para la construcción de este dendrograma se encuentran en el apéndice.

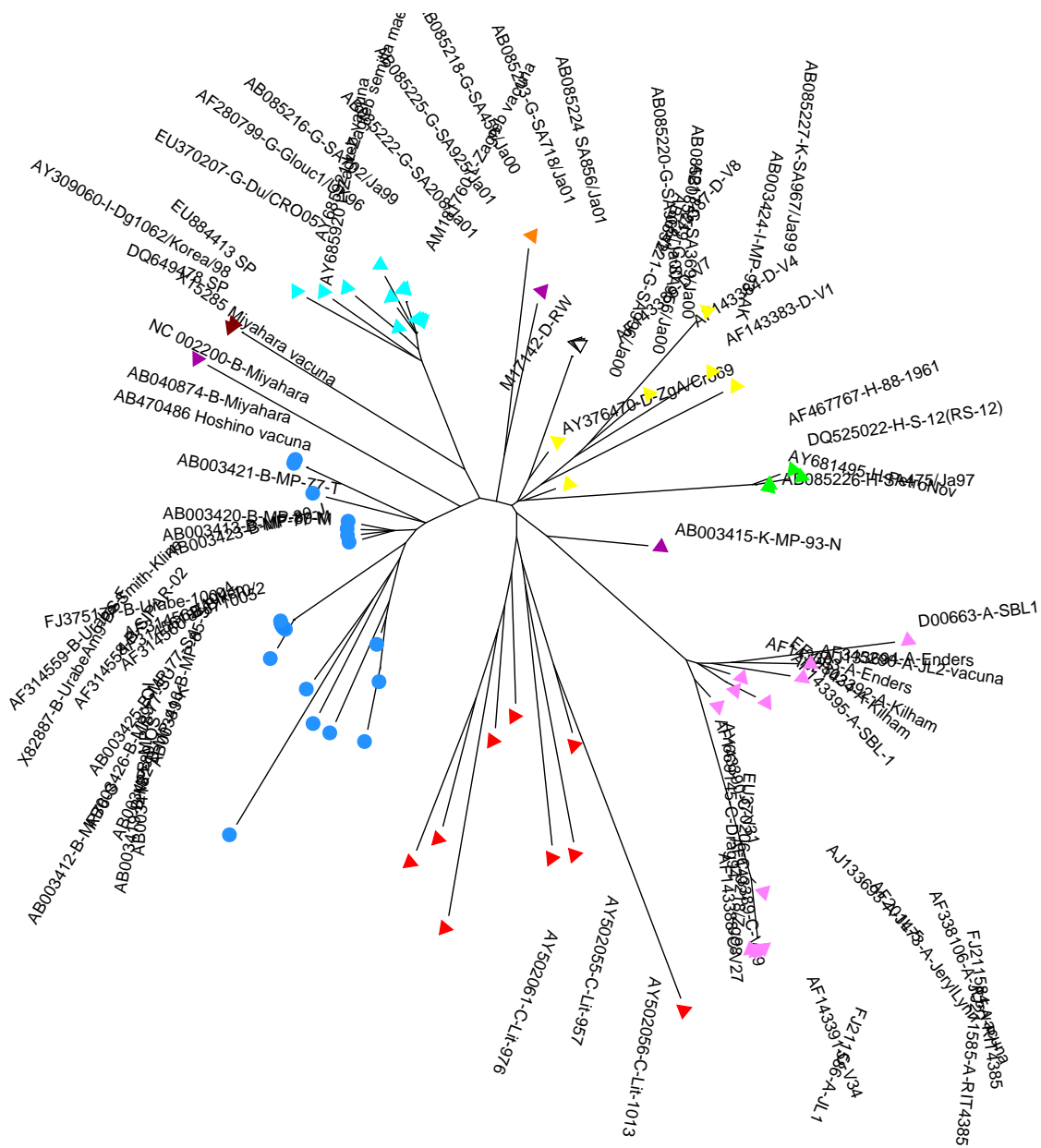


Figura 13. Dendrograma obtenido a partir de los alineamientos de las secuencias de aminoácidos de la proteína F del MuV. Las diferencias se calcularon a través del método de distancia p, para el agrupamiento se utilizó el algoritmo NJ. Los colores representan los diferentes genotipos dados por SH.

▲ A ● B ▲ C ▲ D ▲ F ▲ G ▲ H ▲ I ▲ K △ Cepas Leningrado-Zagreb

En los dendrogramas obtenidos de las secuencias de aminoácidos de las proteínas HN y F (figs. 12 y 13), los colores representan a los genotipos asignados a cada secuencia con base al gen SH. Es importante señalar que no se encontraron secuencias de las proteínas HN y F para todos los genotipos (genotipos E, J, L y M), lo cual restringe de cierta forma este análisis. En el dendrograma construido con las secuencias de proteínas HN (fig. 12), se observa que las secuencias con genotipos A, F, H e I formaron grupos bien definidos, sin embargo, las pertenecientes al genotipo B se dividieron en dos grupos y algunas se combinaron con las de genotipo G, las secuencias con genotipo D se mezclaron con las de K y C. En el caso del dendrograma de las proteínas F (fig. 13), se formaron grupos bien definidos con las secuencias A, B, C, D, F, G y H y los grupos con genotipos I y K quedaron separados.

El análisis de los dendrogramas nos indica que no existe una correspondencia total entre la clasificación basada en el gen SH y el agrupamiento obtenido con las proteínas HN y F, que como se mencionó con anterioridad, son las responsables de la antigenicidad y la neurovirulencia.

III. Identificación de mutaciones en las proteínas HN y F

Se utilizaron los alineamientos de las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos de las proteínas HN y F agrupadas por genotipos para la identificación de mutaciones. Solo se identificaron mutaciones que produjeran un cambio de un aminoácido por otro, es decir, mutaciones de sustitución no sinónimas. Se encontró un total de 203 mutaciones en las secuencias de las proteínas HN y 196 mutaciones en las secuencias de las proteínas F. En ambos casos se localizaron transiciones y transversiones. El número de cambios

encontrados en cada grupo de secuencias por genotipos se presenta en las tablas 6 y 7 y las mutaciones se encuentran en el apéndice.

Tabla 6. Mutaciones encontradas en las secuencias de la proteína HN de MuV agrupadas por genotipos

Genotipo	No. total de mutaciones	No. de transiciones	No. de transversiones	Mutación doble
A	40	22	14	4
B	65	39	21	5
C	32	19	10	3
D	27	18	6	3
F	4	1	2	1
G	8	5	3	0
H	16	9	6	1
I	11	7	4	0
Leningrado-Zagreb	0	0	0	0
Total	203	120	66	17

*No existen secuencias disponibles para los genotipos E, J, L y M

**Solo existe una secuencia disponible con genotipo K, por lo que no se incluye en la tabla.

Tabla 7. Mutaciones encontradas en las secuencias de la proteína HN de MuV agrupadas por genotipos

Genotipo	No. total de mutaciones	No. de transiciones	No. de transversiones	Mutación doble
A	24	13	8	3
B	44	24	19	1
C	62	21	35	6
D	21	7	10	4
F	0	0	0	0
G	16	10	6	0
H	2	2	0	0
I	14	7	5	2
K	13	5	6	2
Leningrado-Zagreb	0	0	0	0
Total	196	89	89	18

*No existen secuencias disponibles para los genotipos E, J, L y M

Se tomaron algunos criterios específicos para darles mayor importancia a ciertas mutaciones. Estos criterios se establecieron con base a las características bioquímicas de los aminoácidos que pudieran tener un impacto sobre la estructura de las proteínas y por consecuencia pudieran afectar a las propiedades biológicas de estas. Los criterios que se establecieron para determinar la importancia de las mutaciones fueron: a) cambios de aminoácidos de acuerdo a la hidrofobicidad, b) capacidad para donar o aceptar puentes de hidrógeno (EPH), c) cambios de cualquier aminoácido por prolina o viceversa, d) cambios de cualquier aminoácido por glicina o viceversa, e) cambios de un aminoácido aromático por uno que no lo es (Martin *et al.*, 2002).

Se identificaron 95 mutaciones significativas en las secuencias de ambas proteínas. En la tabla 8, se presenta el número de mutaciones importantes que se localizaron en las diferentes secuencias de estas proteínas agrupadas por genotipo.

Tabla 8. Número de mutaciones importantes encontradas en las secuencias de las proteínas HN y F del MuV agrupadas por genotipos

Genotipo	No. de mutaciones encontradas en la proteína HN	No. de mutaciones encontradas en la proteína F
A	19	15
B	31	21
C	14	29
D	14	12
F	2	0
G	3	6
H	3	1
I	8	6
K	0	5
Total	95	95

De las mutaciones anteriores, se seleccionaron las que se presentaron en las zonas importantes para las proteínas.

En la proteína HN, las regiones que presentan actividad son el sitio principal de unión al receptor celular (residuos M226, K228, L230, E407, R422, Y540), el segundo sitio de unión al receptor (residuos P162, P175, P530, Y531, N533, I566, V567, V575), el sitio que exhibe actividad de neuraminidasa (residuos R180, D204, E407, R422, R512, Y540, E561), el sitio de promoción de la fusión (residuos S222, M226, K228, L230, V567, Q571) y el sitio de unión a calcio (D268, G270, S272, A302) (tomado de Santos *et al.*, 2009). No se encontraron mutaciones en estas regiones, esto significa que esos aminoácidos están altamente conservados y a que son esenciales para la función de la proteína.

Se han identificado tres epítomos para la neutralización de anticuerpos en la proteína HN, los cuales se encuentran en las regiones 265-288, 329-340, 352-360 (Örvell *et al.*, 1997b; Cusi *et al.*, 2001; Kövamees *et al.*, 1990). Así mismo, se han reconocido 9 sitios potenciales de glicosilación que corresponden a los residuos 12-14, 127-129, 284-286, 329-331, 400-402, 448-450, 464-466, 507-509, 514-516 (Yates *et al.*, 1996). Como se observa en la tabla 9, en la proteína HN se encontraron 26 mutaciones en las regiones que comprenden a los epítomos antigénicos y a los sitios potenciales de glicosilación. Las mutaciones solo correspondieron a los genotipos A, B, C, D, F y G. Es muy probable que el número de cambios aumente con una mayor disponibilidad de secuencias.

En la mayoría de las cepas que presentaron mutaciones, solo se identificaron uno o dos cambios, con excepción de las cepas vacunales Jeryl-Lynn y RIT4385 de genotipo A, en donde se encontraron 4 mutaciones, una en un sitio de glicosilación (H464N) y 3 en epítomos antigénicos (D279A, S333L, P354S).

Tabla 9. Mutaciones encontradas en las secuencias de las proteínas HN de diversas cepas del MuV agrupadas por genotipos

No. de mutación	Cepa del MuV y genotipo en las que se presentó la mutación	Posición (nt)	Cambio de nt en el codón y tipo de mutación	Sitio de la proteína en el que se encuentra la mutación	Cambio y posición de aa	Naturaleza del cambio del aa y criterio de elección
GENOTIPO A						
1	AF338106-A-JL5-vacuna FJ211585-RIT4385	1390	CAC/ AAC Transversión	Sitio de glicosilación	N464H	Básico/polar sin carga*
2	AF345290-A-JL2-vacuna	1390, 1392	CAC/AAA Transición Transición	Sitio de glicosilación	Y464H	Básico/polar sin carga*
3	M55065-A-SBL-1	793	ACC/GCC Transición	Epítipo antigénico	T265A	Polar sin carga /Hidrofóbico hidrofobicidad
4	X93176-A-Enders X93180-A-Rubini	798	GAC/GCC Transversión	Epítipo antigénico	D266A	Hidrofóbico/ácido Hidrofobicidad
5	AF338106-A-JL5-vacuna FJ211585-RIT4385	836	ACC/ATC Transición	Epítipo antigénico	T279I	Polar sin carga /Hidrofóbico Hidrofobicidad
6	AF338106-A-JL5-vacuna FJ211585-RIT4385	1007	TCA/TTA Transición	Epítipo antigénico	S336L	Polar sin carga /Hidrofóbico Hidrofobicidad
7	AY502062-A-KILHAM	1061, 1062	CCA/CAC Transición Transición	Epítipo antigénico	H354P	Hidrofóbico/básico Hidrofobicidad, prolina
8	AF338106-A-JL5-vacuna FJ211585-RIT4385	1062	CCA/CAA Transversión	Epítipo antigénico	Q354P	Hidrofóbico/polar sin carga Hidrofobicidad, prolina
9	EF493026-A-Kilham	1060	CCA/TCA Transición	Epítipo antigénico	S354P	Hidrofóbico/polar sin carga Hidrofobicidad, prolina
GENOTIPO B						
10	AF448531-B-5011	35	AAT/AGT Transición	Sitio de glicosilación	N12 S	Polar sin carga/polar sin carga *
11	AF448528-B-4972 AF448532-B-5012 AF448533-B-5192 AF448529-B-4990 AF448534-B-4971 AF448527-B-4829 AF448530-B-4991	34	AAT/GAT Transición	Sitio de glicosilación	N12D	Polar sin carga/ácido*
12	AF448531-B-5011 AF448528-B-4972 AF448529-B-4990 AF448534-B-4971 AF448527-B-4829 AF448530-B-4991	1205	ACA/ATA Transición	Sitio de glicosilación	T402I	Polar sin carga /Hidrofóbico Hidrofobicidad
13	AF314562-B-871005 FJ375177-B-1004-10/2 AF314559-B-Smith-Kline-Beecham	1392	AAC/AAA Transversión	Sitio de glicosilación	N464K	Polar sin carga/básico*
14	AB003412-B-MP76-S	995	CTC/CCC Transición	Epítipo antigénico	L332P	Hidrofóbico/Hidrofóbico Prolina
15	X93181-B-Urabe-vacuna	1003	AAA/GAA Transición	Epítipo antigénico	E335K	Ácido/básico Formación de puentes de hidrógeno
16	AB003413-B-MP-77-M	1654	GCT/ACT Transición	Epítipo antigénico	A552T	Hidrofóbico/polar sin carga Hidrofobicidad

GENOTIPO C						
17	EU370206-C-9218/Zg98 DQ139782-C-9218/Zg98	34	GAT/AAT Transición	Sitio de glicosilación	D12 N	Ácido/polar sin carga*
18	EU370206-C-9218/Zg98 DQ139782-C-9218/Zg98	37	GCC/ACC Transición	Sitio de glicosilación	T13A	Polar sin carga/Hidrofóbico Hidrofobicidad
19	U37760-C-YLB92 AY669145-C-Drag94	826	ACC/ATC Transición	Epítipo antigénico	T279I	Polar sin carga /Hidrofóbico Hidrofobicidad
GENOTIPO D						
20	X98874-D-London-1 X98875-D-Europe-1	34	AAT/GAT Transición	Sitio de glicosilación	N12D	Polar sin carga/ácido*
21	X98874-D-London-1 X98875-D-Europe-1	37	GCC/ACC Transición	Sitio de glicosilación	A13T	Hidrofóbico/polar sin carga Hidrofobicidad
22	M19933-D-RW	1392	AAC/AAA Transversión	Sitio de glicosilación	N464K	Polar sin carga/básico
23	X98874-D-London-1 X98875-D-Europe-1	1007	TTA/TCA Transición	Epítipo antigénico	S336L	Hidrofóbico/polar sin carga Hidrofobicidad
GENOTIPO F						
24	DQ649478-F- SP/EU884413-F-SP	1391	AAC/ AGC Transición	Sitio de glicosilación	N464/S	Polar sin carga/Polar sin carga*
GENOTIPO G						
25	AF280799-G- Glouc1/UK96	35	AAT/AGT Transición	Sitio de glicosilación	N12S	Polar sin carga/polar sin carga*
26	AF280799-G- Glouc1/UK96	385	CCT/TCT Transición	Sitio de glicosilación	P129S	Hidrofóbico/polar sin carga Prolina

* No son mutaciones significativas, pero se tomaron en cuenta porque podrían afectar a algún sitio potencial de glicosilación. ** Los criterios de selección con respecto a los cambios de aminoácidos fueron los considerados por Martin *et al.*, 2002.

Los sitios importantes para la actividad de la proteína F corresponden al péptido señal (residuos 1-19), al péptido de fusión (residuos 103-127), al sitio de corte por el hospedero (residuos 102-103) y a las regiones de hepta repetidos HR1 y HR2 (aminoácidos 130-172 y 453-477, respectivamente e identificados por homología con la proteína F del SV5, (Carbone *et al.*, 2007). Se encontraron 17 mutaciones en las regiones que corresponden a HR1 y HR2 y 4 cambios en la zona del péptido de fusión (tabla 10).

En el segmento F2 existen 2 sitios potenciales de N-glicosilación (N-X-T) en las posiciones 73-75 y 89-91 y en el segmento F₁ se presentan cinco sitios potenciales de N-glicosilación (N-X-T y N-X-S) en los residuos 182-184, 352-354, 427-429, 433-435, 433-435 y 457-459 (Elango *et al.*, 1989). Se obtuvieron 7 mutaciones en los sitios de glicosilación (tabla 10).

Tabla 10. Mutaciones encontradas en las secuencias de las proteínas F de diversas cepas del MuV agrupadas por genotipos

No. de mutación	Cepa del MuV y genotipo en las que se presentó la mutación	Posición (nt)	Cambio de nt en el codón y tipo de mutación	Sitio de la proteína en el que se encuentra la mutación	Cambio y posición de aa	Naturaleza del cambio del aa y criterio de elección
GENOTIPO A						
1	D00663-A-SBL1	271, 272, 273	GCA/AGC Transición Transversión Transversión	Sitio de glicosilación F2	A91T	Hidrofóbico/polar sin carga Hidrofobicidad
2	AJ133694-A-Enders	271	GCA/ACA Transición	Sitio de glicosilación F2	A91T	Hidrofóbico/polar sin carga Hidrofobicidad
3	AF338106-A-JL5-vacuna FJ211585-A-RIT4385	1429	GTT/TTT Transversión	HR2	V477F	Hidrofóbico/Hidrofóbico Aromático
GENOTIPO B						
4	FJ375177-B-Urabe-1004-10/2 AB003421-B-MP-77-T AB003426-B-MP-77-SU	272	GCA/GTA Transición	Sitio de glicosilación F2	A91V	Hidrofóbico/Hidrofóbico*
5	AB003418-B-MP-89-OI AB003419-B-MP-89-OS	1057	ATA/GTA Transición	Sitio de glicosilación F2	I353V	Hidrofóbico/Hidrofóbico*
6	AB003421-B-MP-77-T	336	GCG/GCC Transversión	Péptido de fusión	A112P	Hidrofóbico/Hidrofóbico Prolina
7	AB003412-B-MP76-S	437	GCA/GGA Transición	HR1	A146G	Hidrofóbico/polar sin carga Hidrofobicidad, glicina
8	AB003412-B-MP76-S	445	CGA/GGA Transversión	HR1	R149G	Básico/polar sin carga Glicina
9	AB003422-B-MP-89-K	473	ACT/ATT Transversión	HR1	T158I	Polar sin carga/Hidrofóbico Hidrofobicidad
GENOTIPO C						
10	AF143391-C-V34	1279	AAC/GAC Transición	Sitio de glicosilación	N427D	Polar sin carga/ácido*
11	AF143391-C-V34	1372	GCA/TCA Transversión	Sitio de glicosilación	A458S	Hidrofóbico/polar sin carga Hidrofobicidad
12	AY502055-C-Lit-957	344	GTT/GGT Transversión	Péptido de fusión	V115G	Hidrofóbico/polar sin carga Hidrofobicidad, glicina
13	AY502055-C-Lit-957	408	GCA/GAG Transversión	HR1	A136E	Hidrofóbico/ácido Hidrofobicidad
14	AF143391-C-V34	410	ATA/AAA Transversión	HR1	I137K	Hidrofóbico/básico Hidrofobicidad
15	AY502061-C-Lit-976	449, 450	GCA/GGT Transversión Transversión	HR1	A150G	Hidrofóbico/polar sin carga Hidrofobicidad, glicina
16	AY502061-C-Lit-976	457, 459	GAA/AAG Transición Transición	HR1	E153K	Ácido/básico Donador o aceptor de EPH
17	AY502056-C-Lit-1013 AY502055-C-Lit-957 AY502061-C-Lit-976	461, 462	TGA/AAA Transversión Transición	HR1	V154E	Hidrofóbico/ácido Hidrofobicidad

18	AY502061-C-Lit-976	494	GTA/GGA Transversión	HR1	V165G	Hidrofóbico/polar sin carga Hidrofobicidad, glicina
19	AF143391-C-V34	1367	GTT/GGT Transversión	HR2	V456G	Hidrofóbico/ polar sin carga Hidrofobicidad, glicina
20	AF143391-C-V34 AF143390-C-V31	1372	GCA/TCA Transversión	HR2	A458S	Hidrofóbico/polar sin carga Hidrofobicidad
21	AF143391-C-V34	1406	GAG/GGG Transición	HR2	E469G	Ácido/polar sin carga Glicina
GENOTIPO D						
22	AF143383-D-V1	314	GGC/GCC Transversión	Péptido de fusión	A105G	Hidrofóbico/polar sin carga Hidrofobicidad, glicina
23	AF143383-D-V1	326, 327	GGC/GCT Transversión Transición	Péptido de fusión	A109G	Hidrofóbico/polar sin carga Hidrofobicidad, glicina
24	AF143386-D-V7	1388	GCC/GAC Transversión	HR2	A463D	Hidrofóbico/ácido Hidrofobicidad
25	AF143384-D-V4	1426, 1427	TCT/ATT Transversión Transición	HR2	S476I	Polar sin carga/Hidrofóbico Hidrofobicidad
GENOTIPO G						
26	AF280799-G-Glouc1/UK96	222	AAG/AAT Transversión	Sitio de glicosilación	K74N	Básico/polar sin carga *
27	EU370207-G-Du/CRO05	1361	GCA/TCA Transversión	HR2	S454I	Polar sin carga/Hidrofóbico Hidrofobicidad
GENOTIPO K						
28	AB003415-K-MP-93-N AB085227-K-SA967/Ja99	1426	TCT/GCT Transversión	HR2	S476A	Polar sin carga/Hidrofóbico Hidrofobicidad

* No son mutaciones significativas, pero se tomaron en cuenta porque podrían afectar a algún sitio potencial de glicosilación. ** Los criterios de selección con respecto a los cambios de aminoácidos fueron los considerados por Martin *et al.*, 2002.

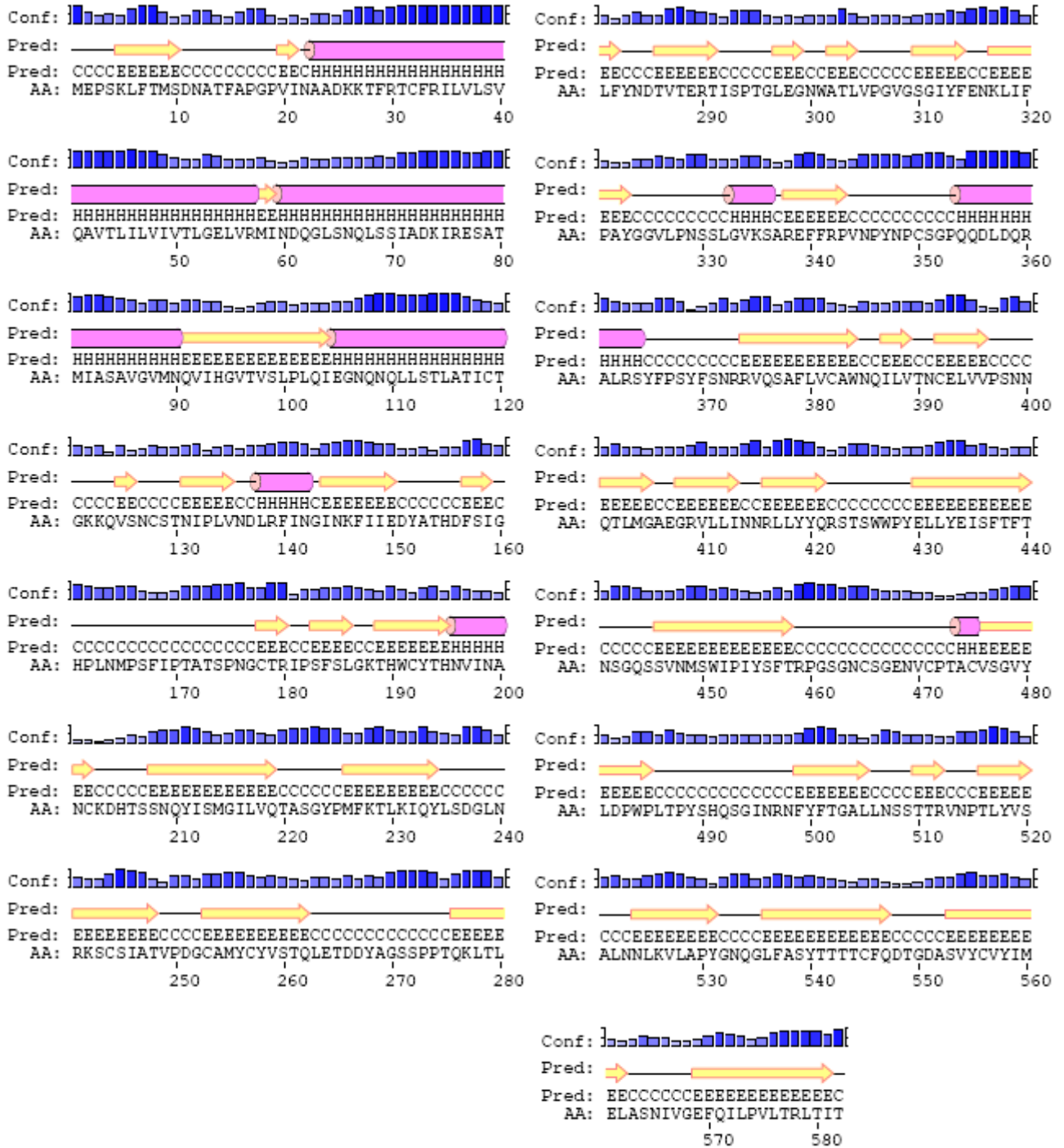
Así como en las proteínas HN, en las secuencias de proteínas F hubo cepas virales que presentaron más de una mutación. La cepa MP-77-T 77 de genotipo B presentó 1 mutación en un sitio potencial de glicosilación (91 A/V) y otra en el péptido de fusión (112 A/P); en la cepa MP76-S, también de genotipo B, se encontraron dos mutaciones en HR1 (146 A/G y 149 R/G), en la cepa V1 se obtuvieron dos mutaciones en el péptido de fusión (105 A/G y 109 A/G), Lit-957 presentó un cambio en el péptido de fusión (115 V/G) y dos en HR1 (136 A/E y 154 V/E), Lit-976 tuvo tres cambios en HR1 (150 A/G, 153 E/K, 154 V/E,

164 V/G) y la cepa que presentó una cantidad más cambios fue AF143391-C-V34 con dos mutaciones en sitios de glicosilación (427 N/D y 458 A/S), un cambio en HR1 (137 I/K) y tres en HR2 (456 V/G, 458 A/S y 469 E/G).

IV. Predicción *in silico* de la estructura secundaria de las proteínas HN y F

La predicción de la estructura secundaria de las proteínas HN y F se realizó para las proteínas correspondientes a la cepa Miyahara, cepa de referencia del MuV en el GenBank (no. de acceso NC_002200).

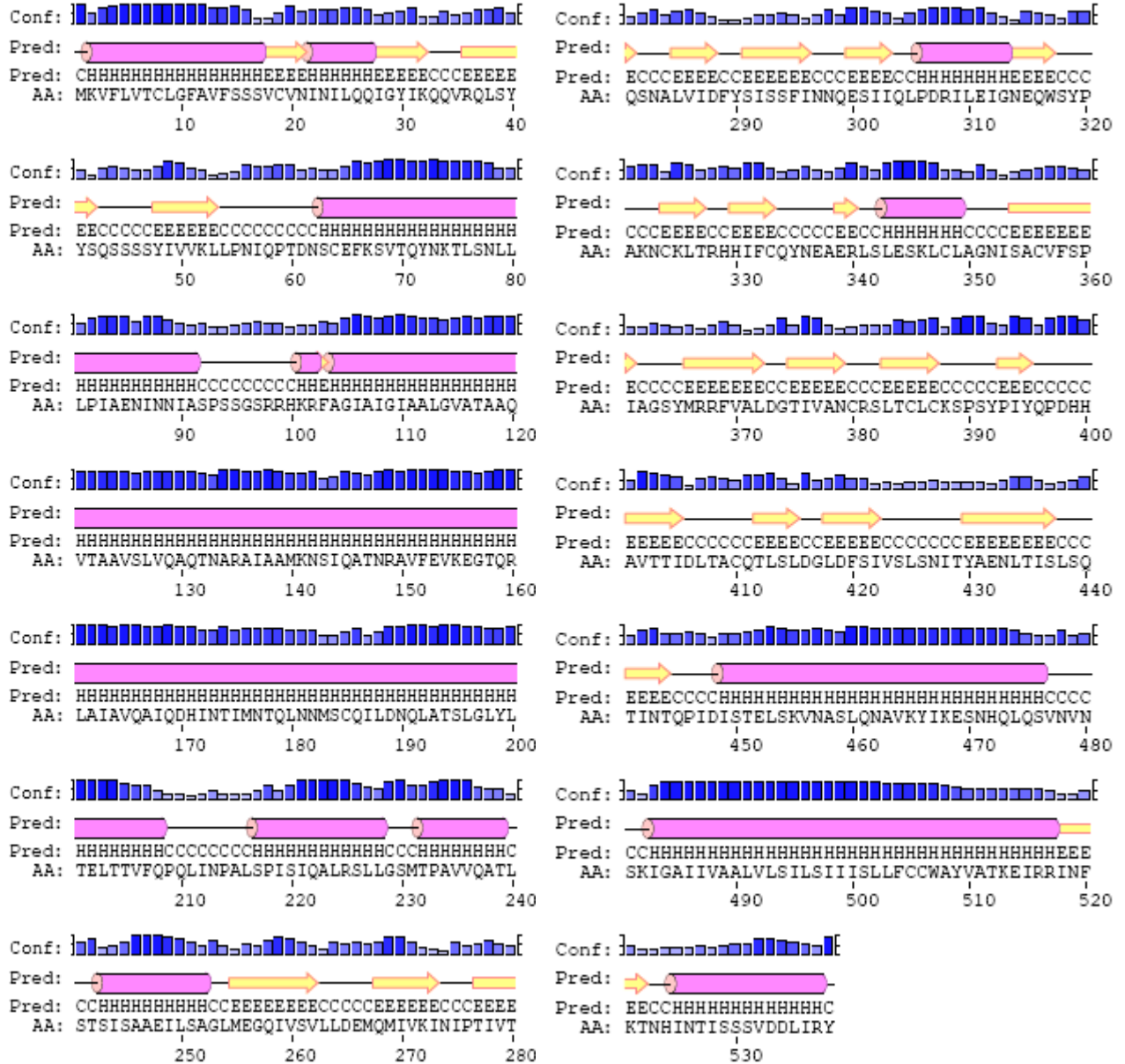
Esta predicción *in silico* se realizó con el servidor PSIPRED v3.0 (Bryson *et al.*, 2005). PSIPRED v3.0 toma en cuenta el grado de conservación de proteínas homólogas encontradas por el programa psi-Blast en una base de datos no redundante (Bryson *et al.*, 2005). Los resultados mostraron que la proteína HN del MuV posee una estructura rica en láminas- β y en menor proporción está formada por hélices- α (fig. 14). En cuanto a la proteína F, se predijo una mayor cantidad de hélices- α que de láminas- β (fig. 15).



α -hélice
 lámina- β
 "loop"
 Conf: [Bar chart icon]
 - + Confianza de la predicción

Pred: estructura secundaria predicha AA: secuencia blanco

Figura 14. Estructura secundaria de la proteína HN del MuV (cepa Miyahara), obtenida con PSIPRED (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred>) Se muestra una mayor cantidad de láminas- β y una menor cantidad de α -hélices.



Conf: } + Confianza de la predicción

Pred: estructura secundaria predicha AA: secuencia blanco

Figura 15. Estructura secundaria de la proteína F del MuV (cepa Miyahara), obtenida con PSIPRED (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred>). Se muestra una mayor cantidad de α -hélices y una menor cantidad de láminas- β .

V. Predicción *in silico* de la estructura terciaria.

Las estructuras tridimensionales de las proteínas HN y F del virus de la parotiditis no están disponibles, por lo que para observar si los cambios identificados en el análisis de mutaciones se ubican en regiones expuestas de estas proteínas y que por lo tanto pudieran tener un impacto sobre ellas, se procedió a determinar la estructura terciaria de forma teórica.

Sabiendo de la existencia de proteínas HN y F cristalizadas de otros paramixovirus, se identificaron los templados que presentaran una mayor identidad con las proteínas en estudio, la cual debería de ser mayor al 40% para obtener modelos confiables (Lesk AM, 2002). Esto se realizó a través de los servidores Geno3D (Combet *et al.*, 2002) y BLASTp del NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins>). Ambos servidores indicaron que las estructuras cristalizadas que presentaron mayor identidad con las proteínas HN y F del MuV, mayor al 40%, pertenecen a las proteínas HN y F del virus del SV5, por lo que estas estructuras se utilizaron como moldes para la predicción utilizando el método de modelación por homología.

Para la modelación de las proteínas por homología se utilizó el programa mejor calificado para este tipo de análisis, MODELLER 9v7 (Sali y Blundell, 1993).

MODELLER 9v7 (Sali y Blundell, 1993) es un programa para la modelación comparativa de estructuras tridimensionales (Eswar *et al.*, 2006; Marti-Renom *et al.*, 2000) de proteínas que se basa en el refinamiento de restricciones espaciales de las secuencias de aminoácidos y de los ligandos que van a ser modelados (Sali y Blundell, *et al.*, 1993; Fiser y Sali, *et al.*, 2000). Este programa se utiliza a través de comandos que se suministran por medio de archivos de código (“scripts”) escritos en lenguaje Python para llevar a cabo los procesos de alineamiento y modelación de la estructura.

Predicción de la proteína HN del MuV

En este caso, se utilizó como molde la estructura cristalizada de la cadena A de la proteína HN del SV5 con clave de acceso 1Z4Z en el PDB (<http://www.pdb.org/pdb/home/home.do>), la cual presentó una identidad del 49% y una similitud del 68% con la secuencia de la proteína HN del MuV, cepa Miyahara (NP_054713, GenBank).

Se eliminaron los primeros 134 aminoácidos de la secuencia a modelar, ya que estos residuos no se encuentran cristalizados en la estructura molde, pues corresponden a la región transmembranal que es hidrofóbica. De los 582 residuos de aminoácidos de la proteína HN del MuV, solo se modelaron 448. La eliminación de estos residuos de aminoácidos permitió también el mejoramiento del alineamiento entre la secuencia problema y la secuencia molde, teniendo una identidad final del 50.3% y una similitud del 69.2% (fig. 16).

Una vez mejorado el alineamiento, se procedió a realizar la modelación. Se ejecutó el programa MODELLER9v7 (Sali y Blundell, 1993) y arrojó 5 modelos teóricos para la estructura tridimensional de la proteína HN del MuV. Se eligió el mejor modelo a través de la función objetivo generada por el programa (la función objetivo es la medida de la energía potencial del modelo, por lo tanto, a menor función objetivo, mejor es el modelo). De los cinco modelos generados por MODELLER9v7 (Sali y Blundell, 1993), el primero fue el que tuvo un menor valor de la función objetivo, por lo que éste fue se utilizó para realizar los análisis posteriores (tabla 11). La visualización de este modelo se hizo con PyMOL (DeLano, 2008).

Se procedió a realizar la evaluación del modelo, es decir, averiguar qué tanto se parece el modelo obtenido con el que se utilizó como templado. Para esto se graficaron los valores de potencial DOPE (Energía Optimizada Discreta de la Proteína) generados por MODELLER9v7 (Sali y Blundell, 1993) tanto para la estructura problema como para el molde. La gráfica de estos valores se presenta a continuación (fig. 17).

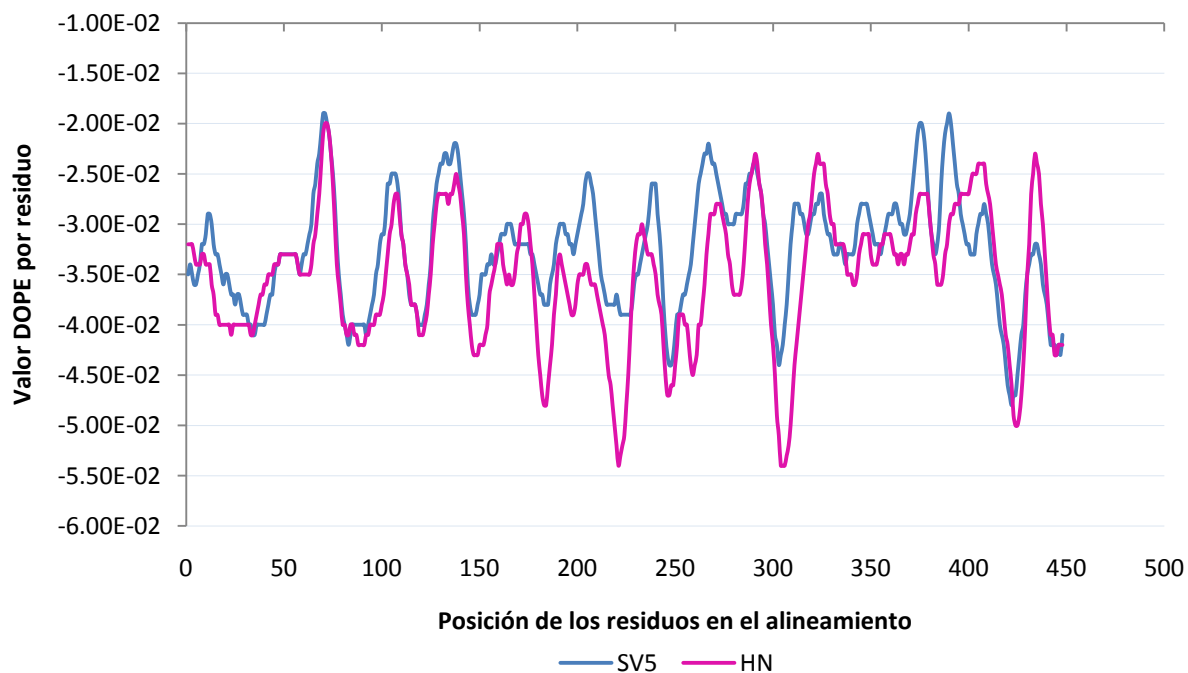


Figura 17. Gráfica de los potenciales DOPE para cada aminoácido de la proteína HN del MuV obtenida *in silico* y de la proteína HN del SV5 utilizada como molde.

En la gráfica se observa que el potencial DOPE correspondiente a la mayoría de los de los residuos de aminoácidos de la estructura modelada fue similar a la residuos de aminoácidos del templado, incluso hay regiones que presentaron una energía potencial menor. Esto nos indicó que el modelo obtenido fue satisfactorio. Solo los residuos de

aminoácidos 360-400 del molde presentaron potenciales DOPE mayores al de los del templado; zona que está constituida por “loops”.

Validación de la estructura de la proteína HN del MuV obtenida *in silico*.

Como parte final del proceso de modelación, se realizó la verificación del modelo obtenido con base a parámetros estereoquímicos con los programas PROCHECK (Laskowski *et al.*, 1993) y DaliLite (Holm y Park, 2000).

Con PROCHECK (Laskowski *et al.*, 1993) se evaluó la calidad estereoquímica de la estructura de la proteína mediante el cálculo del factor G. El factor G provee de una medida de lo “normal” o lo “inusual” para una propiedad estereoquímica dada (longitud de ángulos, torsión de ángulos, etc.). Para tener una buena calidad estereoquímica, se recomienda que el factor G sea superior a -0.5. Un factor G de -0.5 significa una calidad estereoquímica inusual y factores G iguales o menores a -1.0, indican que la calidad estereoquímica es muy inusual., es decir, que la probabilidad de que se adquiriera esa conformación es muy baja. Se obtuvo un factor G de -0.26 para la proteína HN del MuV, lo que nos permitió concluir que la estructura fue estereoquímicamente aceptada.

PROCHECK (Laskowski *et al.*, 1993) también permite la obtención de gráficas de Ramachandran (Ramachandran *et al.*, 1963) las cuales muestran los ángulos de torsión ψ (psi) y ϕ (phy) para todos los residuos de aminoácidos en la estructura (excepto G y P). Se espera que al menos el 90% de los aminoácidos se encuentren en regiones estéricamente favorecidas. El resumen de los resultados obtenidos en esta gráfica se presenta en la tabla 12.

Tabla 12. Resultados de la gráfica de Ramachandran obtenida con PROCHECK para la estructura teórica de la proteína HN del MuV.

Regiones de aceptación	Número de Residuos	Porcentaje (%)
Residuos en regiones más favorecidas	337	87.3
Residuos en regiones adicionalmente permitidas	41	10.6
Residuos en regiones generosamente permitidas	6	1.6
Residuos en regiones no permitidas	2	0.5
Total	386	100

* Se excluyen los residuos de G y P.

En el caso de la proteína HN del MuV, solo el 87.3% de los aminoácidos se encontraron en regiones favorecidas (fig. 18), sin embargo, este valor fue superior al de la estructura de la HN del SV5 que se utilizó como molde, en la cual el 85.4% de los aminoácidos se encontraron en estas regiones., por lo tanto, el modelo obtenido se consideró de buena calidad. El factor G proporcionado por PROCHECK (Laskowski *et al.*, 1993) también valora las gráficas de Ramachandran y como se mencionó anteriormente fue de -0.26, sugiriendo una buena calidad de la gráfica obtenida para esta proteína.

El programa DaliLite (Holm y Park, 2000) también se utilizó para validar el modelo con base a parámetros estereoquímicos estructurales. Con este software se determinaron el Score Z (medida de la calidad del alineamiento estructural) cuyo valor tiene que ser mayor a 20 y el RMSD (desviación de la medida cuadrática, o, medida de la desviación en la distancia de los carbonos- α alineados, dada en Å), a través de cual se pueden comparar las estructuras tridimensionales, el valor de éste debe ser mayor a 0.3. En la tabla 13 se muestran los valores obtenidos en estas pruebas, encontrándose dentro de los rangos esperados, por lo tanto la estructura modelada fue también estereoquímicamente aceptada al utilizar este programa.

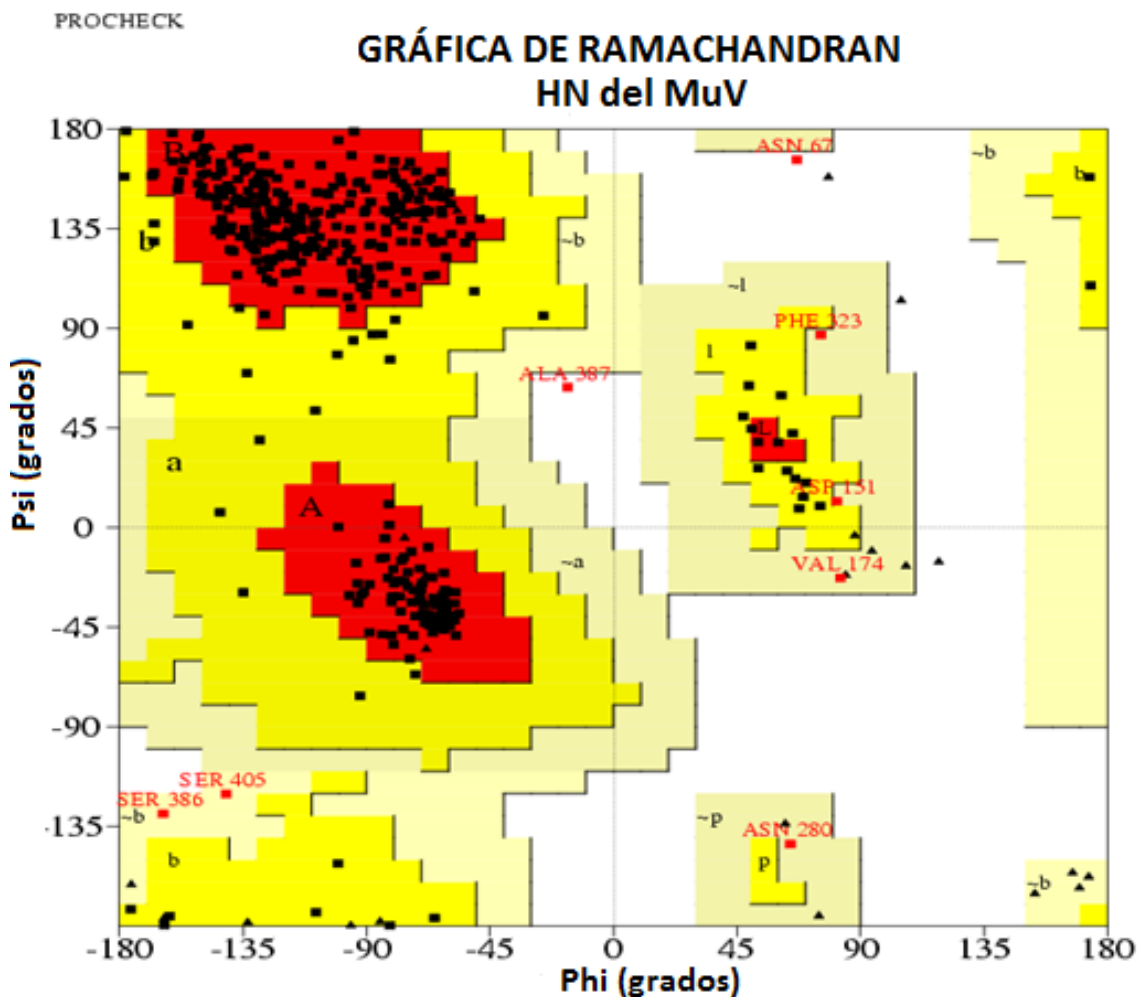


Figura 18. Gráfica de Ramachandran obtenida con PROCHECK (Laskowski *et al.*, 1993) para la proteína HN del MuV. El 87.3% de los residuos de aa corresponden a las regiones con combinaciones de valores de ángulos phi-psi más favorables (áreas en rojo, A, B, L), el 10.6% a las regiones permitidas adicionales (zonas en amarillo, a, b, l, p), el 1.6% a las regiones generosamente permitidas (áreas en beige, ~a, ~b, ~l, ~p) y el 0.5% de los residuos pertenecen a las regiones con combinaciones de ángulos phi-psi no permitidas (zonas en blanco). Los resultados están basados en el análisis de 118 estructuras con una resolución de al menos 2.0 amstrongs (Å) y un factor R no mayor al 20%.

Tabla 13. Resultados obtenidos con DaliLite para la validación con base a parámetros estereoquímicos de la estructura teórica de la proteína HN del MuV.

Parámetro	Valor esperado	Valor obtenido
Score Z	> 20	71.5
RMSD (Å)	< 0.3	0.3

Dado que en los procesos de validación para la estructura terciaria de la proteína HN del MuV obtenida *in silico* fueron satisfactorios, esta estructura proteica se pudo considerar como un buen modelo. En la figura 19 se presenta el modelo teórico de la estructura tridimensional de la proteína HN del MuV. que presentó una configuración de propela formada por grupos de 6 láminas- β plegadas con 4 hélices- α . La estructura resultó ser rica en láminas- β , como se mostró en la predicción de la estructura secundaria.

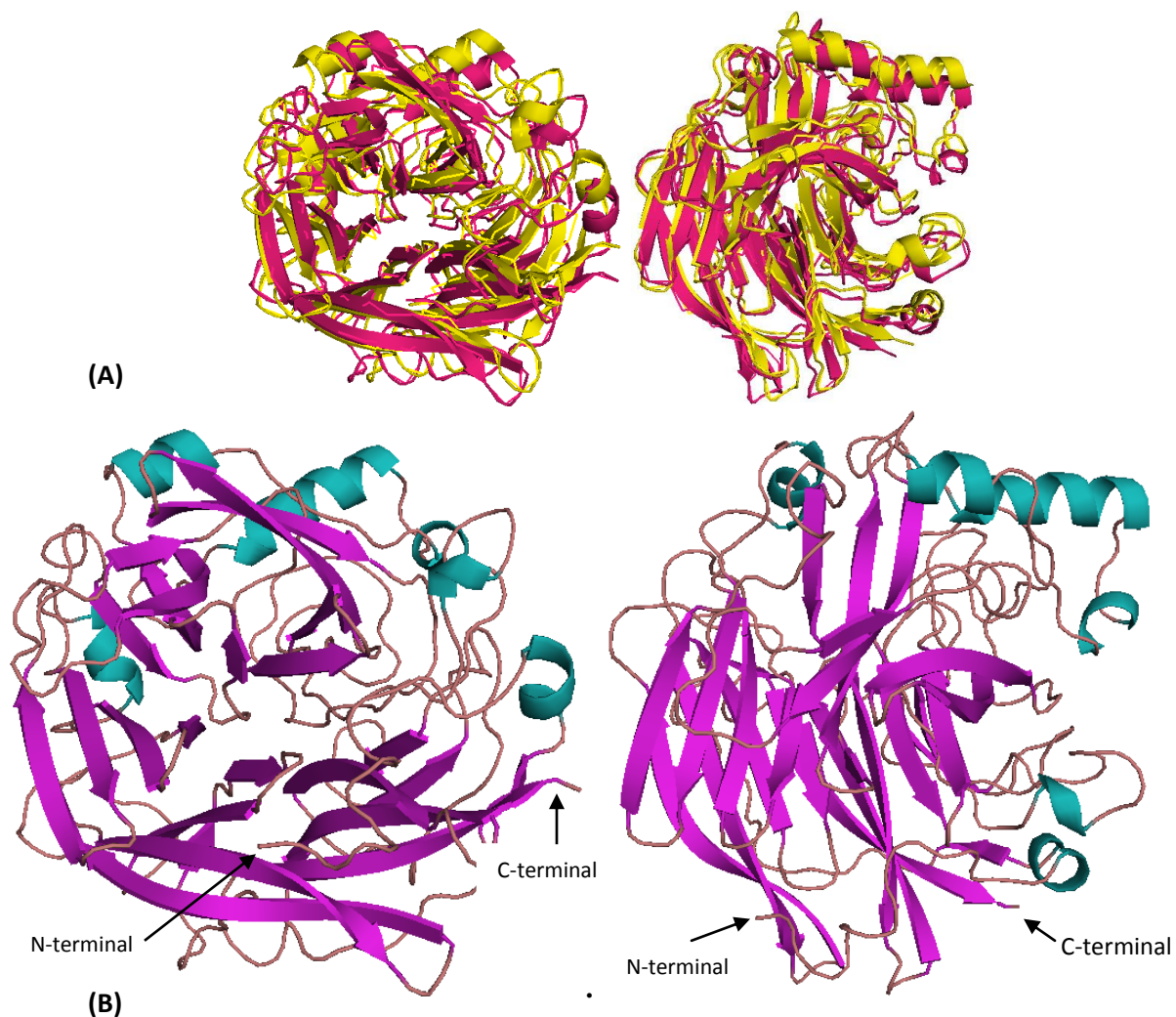


Figura 19. Estructura tridimensional de la proteína HN del MuV obtenida *in silico* con MODELLER9v7. (A) Diagrama en caricatura de las proteínas HN del MuV (rosa) y del SV5 (amarillo) sobrepuestas, se muestra una buena correspondencia entre las dos estructuras. (B) Diagrama en caricatura de la proteína HN del MuV, en rosa se observan 6 grupos formados por 4 láminas β , las α -hélices se observan en color azul.

Predicción *in silico* de la estructura terciaria de la proteína F del MuV.

Para la predicción teórica de la estructura tridimensional de la proteína F del MuV, se utilizó como templado a la proteína F del SV5, con clave de acceso 2B9B en el PDB (<http://www.pdb.org/pdb/home/home.do>), la cual está cristalizada como trímero completo (tres cadenas, A, B y C), a diferencia de la proteína HN que sólo se encuentra como monómero (solo la cadena A). Por lo tanto, fue posible modelar a la proteína F del MuV en su forma trimérica. Se utilizó la secuencia de la proteína F del MuV, cepa Miyahara, para modelar (NP_054711, GenBank).

La proteína F del SV5 presentó una identidad del 41% y una similitud del 60% con la proteína F del MuV. Para obtener un buen modelo, se eliminaron los aminoácidos equivalentes a los de la secuencia de la estructura molde que no fueron cristalizados en cada una de las cadenas. Así, de la cadena A se eliminaron los residuos 467-475, 472-480, 483-496, de la cadena B fueron excluidos los residuos 467-475, 472-480 y 482-495, y finalmente, de la cadena C no se tomaron en cuenta los residuos 466-474, 472-480 y 482-495, además, a todas las se les eliminaron los primeros 19 residuos de aminoácidos. En total, de los 538 aminoácidos que forman un monómero de la proteína F del MuV, se modelaron 487.

Se procedió a realizar la predicción de la estructura terciaria a través de MODELLER 9v7 (Sali y Blundell, 1993) el cual generó cinco modelos con los siguientes valores de la función objetivo (medida de la energía potencial del modelo) (tabla 14).

Tabla 14. Valores de la función objetivo de los modelos de la proteína HN del MuV generados por MODELLER9Vv7

Modelo	Función valor objetivo
FMUV.B99990001.pdb	7966.02734
FMUV.B99990002.pdb	7937.67822
FMUV.B99990003.pdb	7750.03418
FMUV.B99990004.pdb	7376.35449
FMUV.B99990005.pdb	8165.70703

El modelo cuatro fue el que presentó una menor función objetivo por lo que se eligió para continuar con el análisis. La estructura se visualizó con PyMOL (DeLano, 2008)

Se calcularon los potenciales DOPE de los residuos del modelo predicho para la estructura de la proteína HN del MuV y de la estructura molde los cuales se graficaron para la evaluación del modelo elegido (fig. 20).

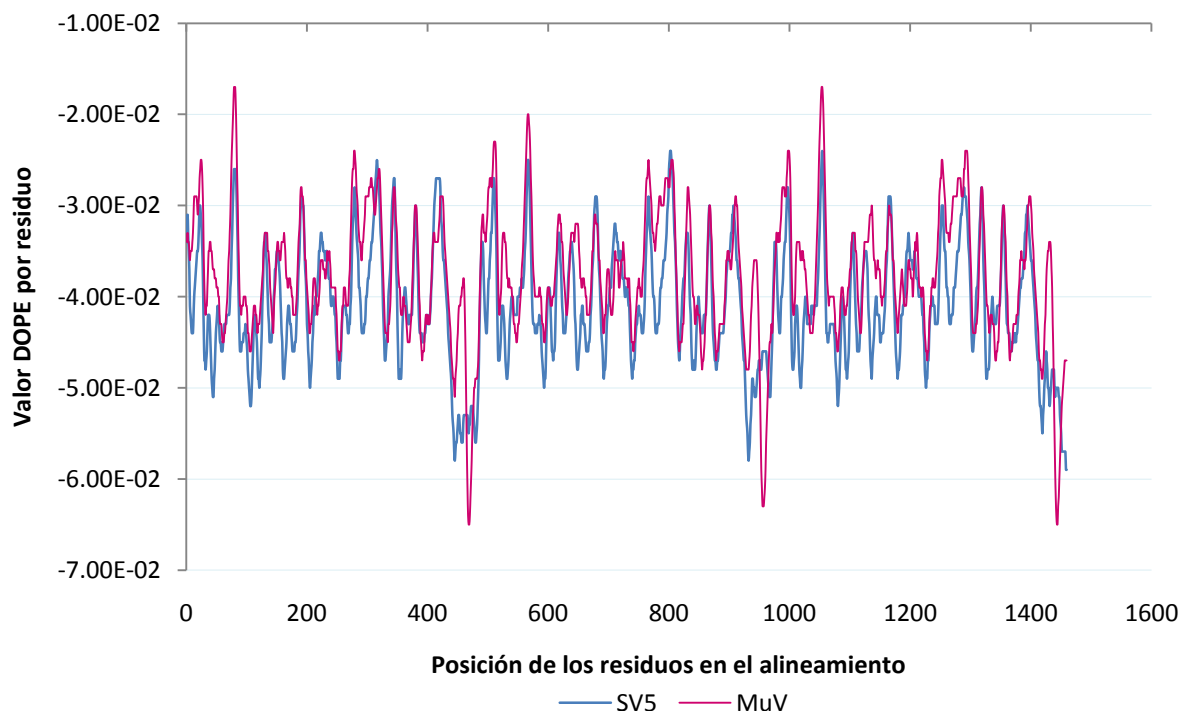


Figura 20. Gráfica de los potenciales DOPE para cada aminoácido de la proteína F del MuV obtenida *in silico* y de la proteína F del SV5 utilizada como molde.

En la gráfica se puede observar que el potencial DOPE de gran parte de los residuos de la proteína molde es menor que el potencial de los residuos de la estructura modelada, sin embargo, dado que la diferencia entre estas estructuras fue muy pequeña y se presentó una buena correspondencia entre ellas, este modelo se consideró como satisfactorio.

Validación de la estructura teórica de la proteína F del MuV

El modelo obtenido para la proteína F del MuV se validó a través de parámetros estereoquímicos con los software PROCHECK (Laskowski *et al*, 1993) y DaliLite (Holm y Park, 2000).

Al utilizar PROCHECK (Laskowski *et al*, 1993), se obtuvo un factor G de de -0.3 y una gráfica de Ramachandran con el 92.9% de los residuos de aminoácidos dentro de las regiones favorecidas estéricamente (fig. 21). Estos valores sugirieron un modelo estereoquímicamente aceptable. El resumen de los resultados proporcionados por las gráficas de Ramachandran se presenta en la tabla 15.

Tabla 15. Resultados de la gráfica de Ramachandran obtenida con PROCHECK para la estructura teórica de la proteína F del MuV.

Regiones de aceptación	Número de Residuos	Porcentaje (%)
Residuos en regiones más favorecidas	1262	92.9
Residuos en regiones adicionalmente permitidas	90	6.6
Residuos en regiones generosamente permitidas	7	0.5
Residuos en regiones no permitidas	0	0.0
Total	1359	100

* Se excluyen los residuos de G y P.

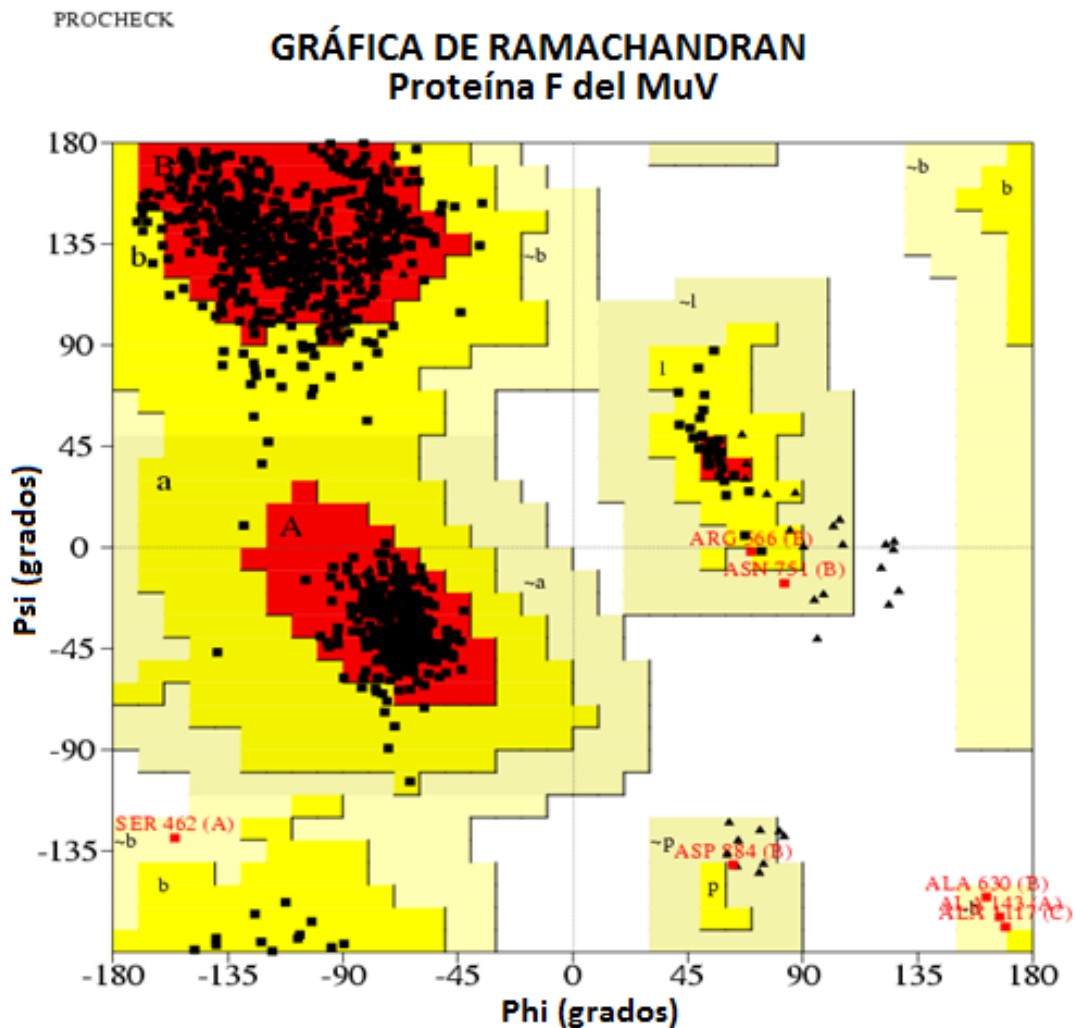


Figura 21. Gráfica de Ramachandran obtenida con PROCHECK (Laskowski *et al.*, 1993) para la proteína F del MuV. El 92.9% de los residuos de aa corresponden a las regiones con combinaciones de valores de ángulos phi-psi más favorables (áreas en rojo, A, B, L), el 6.6% a las regiones permitidas adicionales (zonas en amarillo, a, b, l, p), el 0.5% a las regiones generosamente permitidas (áreas en beige, ~a, ~b, ~l, ~p) y el 0.0% de los residuos pertenecen a las regiones con combinaciones de ángulos phi-psi no permitidas (zonas en blanco). Los resultados están basados en el análisis de 118 estructuras con una resolución de al menos 2.0 amstrongs (Å) y un factor R no mayor al 20%.

Los datos obtenidos para la validación con base a parámetros estereoquímicos geométricos por medio de DaliLite (Holm y Park, 2000) se presentan en la tabla 16.

Tabla 16. Resultados obtenidos con DaliLite para la validación con base a parámetros estereoquímicos de la estructura teórica de la proteína F del MuV.

Prueba	Valor esperado	Valor obtenido		
		Cadena A	Cadena B	Cadena C
Score Z	> 20	51.8	46.5	46.2
RMSD	< 0.3	1.0	1.0	1.0

Los resultados de esta prueba se encontraron dentro de los rangos esperados, por lo tanto la estructura modelada fue aceptada, pudiéndose utilizar para los análisis posteriores.

En el modelo teórico de la estructural final de la proteína F del MuV obtenido, se presentó como un trímero conteniendo una cabeza globular unida a un tallo con estructura de “coiled-coil” en el extremo carboxilo terminal (fig. 22). En este caso, también se confirmó la estructura secundaria predicha rica en α -hélices.

VI. Ubicación de las mutaciones en las estructuras predichas de las proteínas HN y F del MuV.

Como parte final del trabajo, las mutaciones encontradas en las secuencias de las proteínas HN y F de MuV agrupadas por genotipos se ubicaron en las estructuras tridimensionales obtenidas. Sólo se ubicaron los residuos de aminoácidos que se encontraron en las regiones modeladas. En las figuras 23 y 24, se presentan los cambios encontrados por genotipos sobre la estructura tridimensional de dichas proteínas.

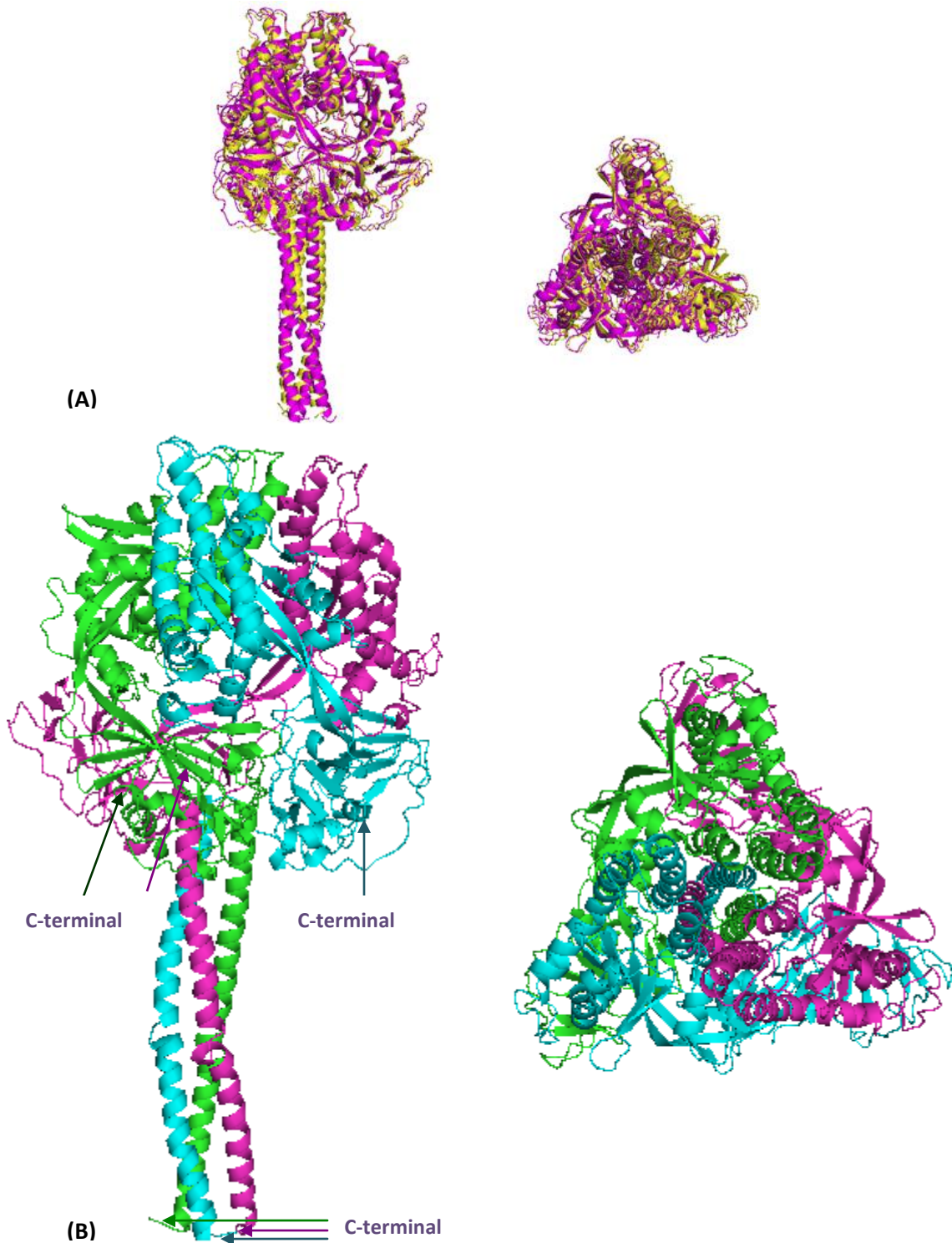


Figura 22. Estructura tridimensional de la proteína F del MuV obtenida *in silico* con MODELLER9v7. (A) Diagrama en caricatura de las proteínas F del MuV (rosa) y del SV5 (amarillo) sobrepuestas, se muestra una buena correspondencia entre las dos estructuras. (B) Diagrama en caricatura del trímero de la proteína F del MuV, las cadenas A, B y C se muestran en color verde, azul y rosa, respectivamente. Se observa la cabeza globular unida a un tallo con estructura de “coiled-coil”.

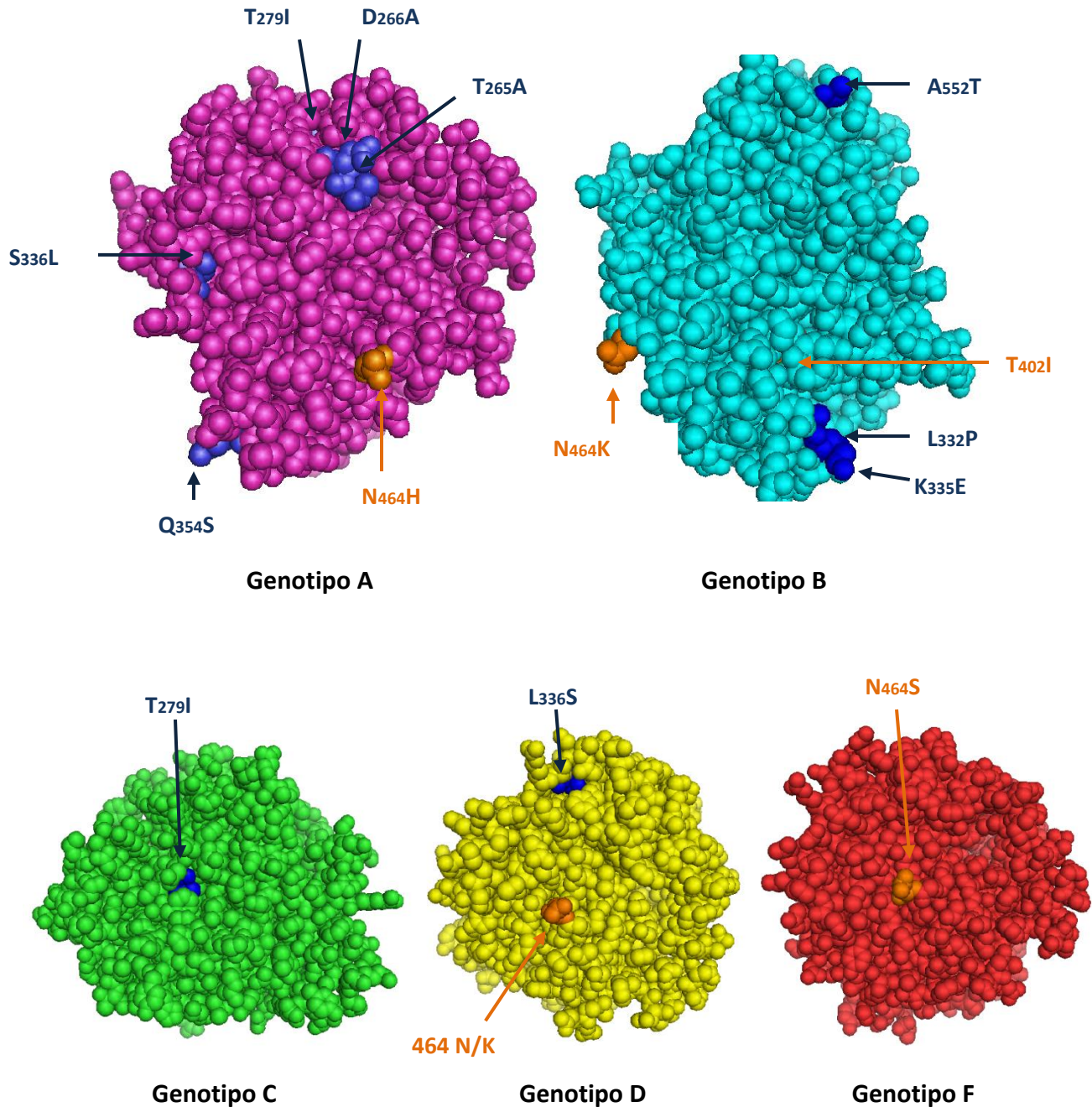


Figura 23. Diagramas en esferas de la proteína HN del MuV mostrando las mutaciones identificadas en regiones importantes en diferentes genotipos (A, B, C, D, F), se observa que los cambios se presentan la superficie de la estructura. Los colores en el sitio de mutación corresponden a la zona de importancia de la proteína: cambio en epítomos antigénicos (azul), cambios en sitios potenciales de glicosilación (anaranjado).

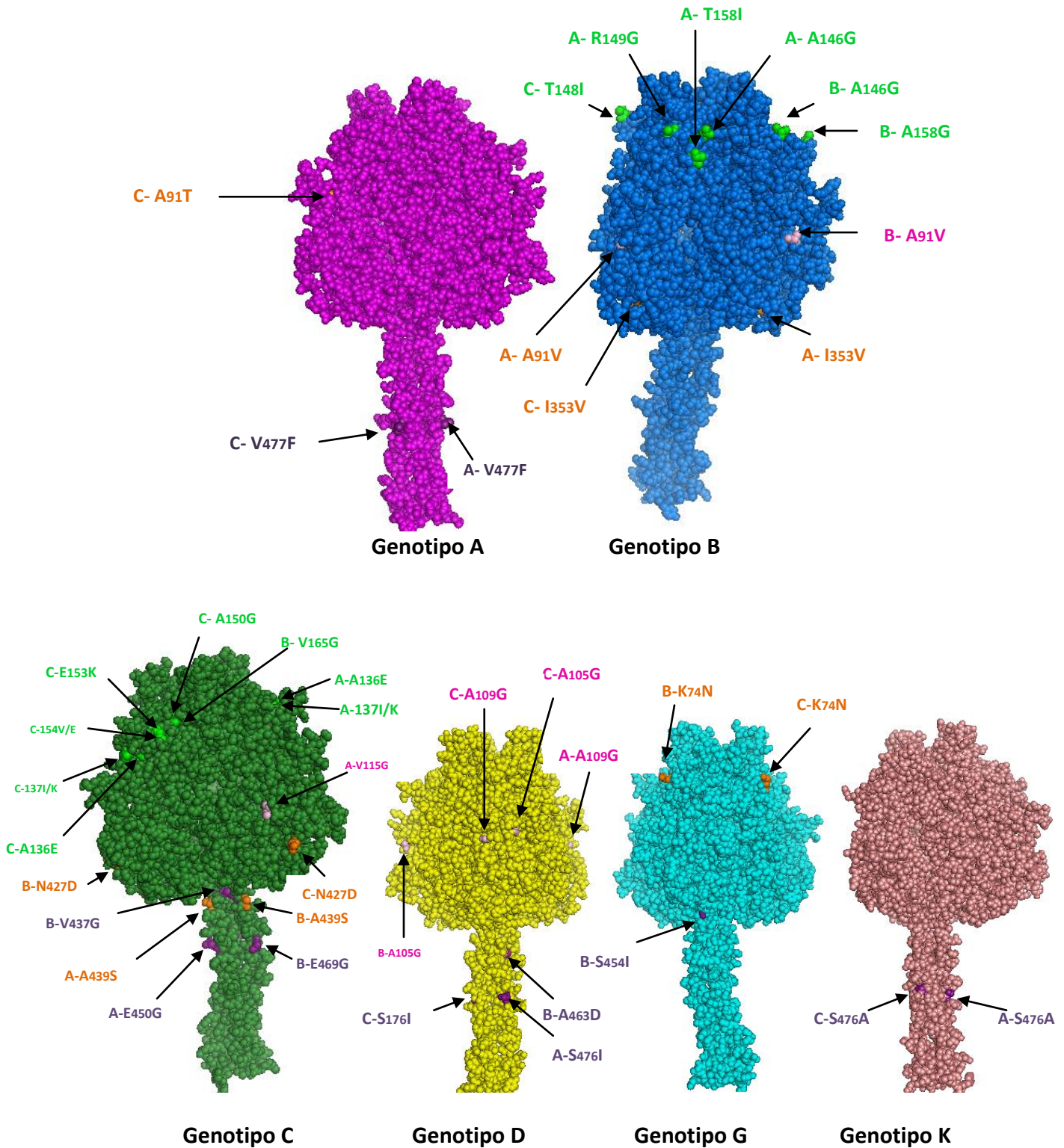


Figura 25. Diagramas en esferas de la proteína F del MuV mostrando las mutaciones identificadas en regiones importantes en diferentes genotipos (A, B, C, D, G, K), se observa que los cambios se presentan en la superficie de la estructura. Los colores en el sitio de mutación corresponden a la zona de la proteína: cambios en HR1 (verde), cambios en HR2 (morado), cambios en sitios potenciales de glicosilación (anaranjado), cambios en el péptido de fusión (rosa). Las letras iniciales en la nomenclatura de las mutaciones significan la cadena de la proteína en la que se encuentra la mutación.

Las mutaciones encontradas en los residuos 12, 13 y 129 no se ubicaron en la estructura de la proteína HN del MuV porque la región correspondiente a esa zona no fue modelada. Todos los demás cambios se ubicaron en la superficie de las proteínas HN y F modeladas. Debido a la naturaleza de las mutaciones encontradas es probable que la estructura de la proteína se modifique.

Se calcularon los cambios de energía libre de Gibbs para las mutaciones más importantes identificadas sobre las estructuras de las proteínas HN y F del MuV. Esto se hizo utilizando el programa PopMusic v2.0 (<http://babylone.ulb.ac.be/popmusic/index.php>), el cual predice los cambios en la estabilidad de proteínas mutantes con base el cálculo de la energía libre de Gibbs, de esta manera, energías libres con valores positivos desestabilizan a la estructura de la proteína. Los resultados obtenidos en este análisis se presentan en las tablas 17 y 18.

Tabla 17. Cambios de energía libre de Gibbs producidos por las mutaciones identificadas en regiones importantes de la proteína HN del MuV

Genotipo	Posición	Mutación	ΔGG Kcal/mol	Energía libre
A	265	T/A	1.09	Desestabilización
A	266	D/A	0.19	Desestabilización
A	279	T/I	0.03	Desestabilización
A	202	S/L	1.04	Desestabilización
A	220	P/Q	-0.38	No desestabiliza
B	402	T/I	0.07	Desestabilización
B	330	N/K	0.38	Desestabilización
B	332	L/P	1.69	Desestabilización
B	552	A/T	0.37	Desestabilización
C	279	T/I	0.03	Desestabilización
D	464	N/K	0.38	Desestabilización
F	330	N/S	-0.06	No desestabiliza

*Valores calculados con PopMusic v2.0

Tabla 18. Cambios de energía libre de Gibbs producidos por las mutaciones identificadas en regiones importantes de la proteína F del MuV

Genotipo	Posición	Mutación	ΔGG Kcal/mol	Efecto
A	477	V/F	1.04	Desestabilización
B	146	A/G	0.49	Desestabilización
B	158	T/I	0.10	Desestabilización
C	136	A/E	0.40	Desestabilización
C	137	I/K	2.39	Desestabilización
C	150	A/G	1.64	Desestabilización
C	153	E/K	0.19	Desestabilización
C	154	V/E	3.29	Desestabilización
C	165	V/G	3.87	Desestabilización
C	456	V/G	3.18	Desestabilización
C	458	A/S	0.57	Desestabilización
C	469	E/G	1.54	Desestabilización
D	463	A/D	2.61	Desestabilización
D	476	S/I	1.06	Desestabilización
G	454	S/I	0.10	Desestabilización

*Valores calculados con PopMusic v2.0

Los resultados obtenidos en las tablas 18 y 19, apoyan la teoría de que las mutaciones encontradas en las proteínas analizadas pueden tener un impacto importante sobre la estructura y en consecuencia en su función, ya que la mayoría de estos cambios podrían desestabilizar a la proteína.

DISCUSIÓN

El virus de la parotiditis (MuV) es el agente causal de la parotiditis, enfermedad también conocida como “paperas”. Esta es una infección común en niños (Hviid *et al.*, 2008), sin embargo, puede provocar complicaciones a nivel de sistema nervioso central como meningitis y encefalitis en adolescentes y adultos, entre otras (Jin *et al.*, 2004).

Se considera que el MuV es serológicamente monotípico (Bonnet *et al.*, 2006), sin embargo, con base a la secuencia del gen SH, se han identificado 13 genotipos diferentes (nombrados de A a M) y su distribución en el mundo es variable (Santos *et al.*, 2008).

Aunque el uso masivo de vacunas ha reducido exitosamente la infección con el MuV a nivel mundial desde 1960, los brotes de este virus no se han eliminado completamente, aún en poblaciones con altos índices de vacunación (Lee *et al.*, 2004). Recientemente estos brotes se han atribuido a la incapacidad de las vacunas (que son de genotipos A y B) para neutralizar cepas de virus con genotipos heterólogos, además de que se han relacionado algunas cepas virales de ciertos genotipos con una mayor neurovirulencia.

Las propiedades antigénicas y de virulencia del MuV se deben a las glicoproteínas HN y F. La proteína HN está relacionada con la unión al receptor celular (ácido siálico) y contiene los epítomos para la generación de anticuerpos neutralizantes (Wolinsky *et al.*, 1985; *et al.*, 1997b; Cusi *et al.*, 2001; Kövamees *et al.*); mientras que la proteína F es el principal determinante de neurovirulencia y realiza la fusión de las membranas viral y celular, al ser activada por HN (Lemon *et al.*, 2007).

La clasificación molecular basada en el gen SH de las cepas del MuV es importante para la epidemiología de estas infecciones, pero no es informativa con respecto a las propiedades antigénicas y de neurovirulencia de estos virus, que como ya se mencionó, están dadas por

las proteínas HN y F, razón por la cual, en este trabajo se realizó un análisis bioinformático para determinar si existe alguna relación entre la clasificación genética de este virus y las propiedades biológicas de las proteínas anteriormente mencionadas.

Se construyeron dendrogramas a partir de las secuencias de aminoácidos de las proteínas SH, HN y F del virus, clasificadas por genotipos. En el dendrograma de las secuencias de la proteína SH (fig. 11) de manera general, se obtuvo un agrupamiento que correspondió al genotipo dado por el gen SH. Las secuencias con genotipos A, B, C, E, F, G, H, I, J, L y M formaron grupos bien definidos. Las secuencias pertenecientes a los genotipos D formaron dos o tres grupos; la longitud de estas secuencias varía entre 174 y 318 nt, revelando que la tipificación de algunas de las cepas pertenecientes a estas secuencias no se realizó con los 316 nt como está estandarizado, lo cual sugiere que el tamaño de las secuencias de las cepas virales a clasificar es importante y tiene una influencia considerable en la genotipificación del virus. Las secuencias pertenecientes al genotipo K se mezclaron con secuencias de genotipos J y D, esto probablemente también se deba a la variación del número de nucleótidos de cada secuencia utilizada para tipificar (174, 299 y 316 nt), además de las diferencias en cuanto a los criterios que se tomaron en el momento de la clasificación, ya que por ejemplo, la cepa DK/81/01 primero fue clasificada como genotipo J por Tecle et al. (2001) y posteriormente se reclasificó como genotipo K por Jin et al. (2003). Por este motivo es importante que se tome en consideración la propuesta hecha por Jin et al. (2005) sobre los criterios estandarizados para la genotipificación de las diferentes cepas del MuV.

Debido a que la asociación de las secuencias de aminoácidos de la proteína SH correspondió al agrupamiento dado por el gen SH, el análisis de los dendrogramas se utilizó para observar la agrupación de las secuencias de las proteínas HN y F y compararlo con el genotipo dado por SH.

En el dendrograma construido con las secuencias de proteínas HN (fig. 12), las secuencias con genotipos A, F, H e I formaron grupos bien definidos, las pertenecientes al genotipo B se dividieron en dos grupos y algunas se combinaron con las de genotipo G, las secuencias con genotipo D se mezclaron con las de C y la secuencia con genotipo K se agrupó con las de genotipo D. En el dendrograma de las proteínas F (fig. 13), se formaron grupos de secuencias con genotipos A, B, C, D, F, G y H y los grupos con genotipos I y K quedaron separados.

Este análisis de dendrogramas mostró que no existe una correspondencia total entre la clasificación basada en el gen SH y que el agrupamiento obtenido con las proteínas HN y F, las cuales son responsables de la antigenicidad y neurovirulencia del MuV. Es importante señalar en este caso, la necesidad de contar con más secuencias de proteínas HN y F para poder realizar un análisis con bases más sólidas, pues desafortunadamente no existen secuencias disponibles de estas proteínas para todos los genotipos basados el gen SH.

En el análisis de mutaciones identificadas en las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos de las proteínas HN y F agrupadas por genotipos, solamente se obtuvieron mutaciones puntuales y de éstas solo se tomaron en cuenta las mutaciones no sinónimas, es decir, los cambios de nucleótidos que provocan el cambio de un aminoácido por otro aminoácido diferente. De estas mutaciones se seleccionaron las que pudieran tener un impacto en la estructura de la proteína y en consecuencia que afectaran a la función de la

misma; los criterios de selección de estas mutaciones fueron los utilizados por Martin *et al.* (2002).

En las secuencias de las proteínas HN del MuV agrupadas por genotipos, no se encontraron mutaciones en los sitios putativos de unión al receptor celular, de actividad de neuraminidasa, sitio de promoción de la fusión ni en el sitio de unión a calcio (Santos *et al.*, 2009), lo cual refleja el alto grado de conservación y la importancia de estas regiones para la proteína. Por otro lado, se identificaron 26 mutaciones en estas secuencias, las cuales se encontraron en sitios potenciales de glicosilación y en epítomos antigénicos (Yates *et al.*, 1996, Örvell *et al.*, 1997b; Cusi *et al.*, 2001; Kövamees *et al.*, 1990).

Las mutaciones encontradas en sitios potenciales de glicosilación (Yates *et al.*, 1996, Örvell *et al.*, 1997b; Cusi *et al.*, 2001), como H464N y H464Y en cepas de genotipo A; N12S y N12D, I402T y N464K en cepas de genotipo B; D12N y T13A en secuencias de genotipo C; N12D, A13T y N464K en cepas con genotipo D; N464S en el genotipo F; y N12S y P29S en cepas con genotipo G, muy probablemente no tienen un impacto significativo sobre la estructura de la proteína, ya que se encuentran residuos asparagina o de serina muy cercanos a estas regiones, lo cual podría indicar que estos sitios de glicosilación solo se encuentran recorridos en la secuencia de la proteína.

Los cambios más importantes y que probablemente pudieran tener un efecto sobre la proteína se encontraron en las regiones correspondientes a los epítomos antigénicos (Kövamees *et al.*, 1990) y se dieron únicamente en las secuencias de proteínas con genotipos A, B, C y D. En las secuencias de genotipo A estos cambios se encontraron en las posiciones T265A, D266A, T279I, S336L, H354P, Q354P y S354P. En secuencias con genotipo B se identificaron los cambios L332P, E335K, A552T. En cepas con genotipos C y D solo se encontró una mutación, T279I y S336L, respectivamente.

Con respecto a las mutaciones encontradas en la proteína F del MuV, igualmente se encontraron cambios en sitios potenciales de glicosilación (Elango *et al.*, 1989), A91T en secuencias con genotipo A; A91V y I353V en secuencias de genotipo B; N427D y A458S en proteínas con genotipo C; y K74N en secuencias con genotipo G. Como sucedió en la proteína HN, hay poca probabilidad que estos cambios afecten a la estructura de la proteína debido a la presencia inmediata de N o de S en la vecindad de estos aminoácidos.

Se encontraron mutaciones en las regiones de hepta repetidos de la proteína F (Carbone *et al.*, 2007). En HR1 A146G, R149G y T158I en cepas con genotipo B; A136E, I137K, A150G, E153K, V154E y V165G en las proteínas con genotipo C. Las mutaciones que se encontraron en HR2 fueron V477F en secuencias con genotipo A; V456G, A458S y E469G en secuencias de genotipo C; A463D y S476I en proteínas con genotipo D; S454I en secuencias con genotipo G; y S476A en grupos de proteínas con genotipo K. Las mutaciones en estas regiones son muy importantes, ya que se podría ver afectada la fusogenicidad de la proteína.

Con el propósito de ubicar las mutaciones importantes en la estructura de las proteínas HN y F del MuV y dado que no están disponibles en su forma tridimensional, se hizo a la predicción *in silico* de las estructuras secundaria (con PSIPRED v3.0 [Bryson *et al.*, 2005]) y terciaria (utilizando MODELLER 9V7 [Sali y Blundell, 1993]) de dichas proteínas.

La estructura secundaria de la proteína HN del MuV predicha resultó ser rica en láminas- β (fig. 14), mientras que la de la proteína F presentó una mayor cantidad de hélices- α (fig. 15), parecido a lo reportado para otros paramixovirus como el SV5 (Yuan *et al.*, 2005, Yin *et al.*, 2006).

El arreglo tridimensional final de un monómero (cadena A) (previamente evaluado y validado) de la proteína HN del MuV obtenido *in silico* mostró una configuración de propela formada por grupos de 6 láminas- β plegadas (fig. 19), muy parecido al de la estructura utilizada como templado (proteína HN del SV5) (Yuan *et al.*, 2005). La proteína F, también previamente evaluada y validada, mostró un arreglo final trimérico, conteniendo una cabeza globular unida a un tallo con estructura de “coiled-coil” en el extremo carboxilo terminal (fig. 22), semejante al de la proteína F del SV5 (Yin *et al.*, 2006).

Todos los cambios de aminoácidos que se identificaron en las zonas correspondientes a los epítomos antigénicos de la proteína HN y que correspondieron a los grupos de secuencias con genotipo A, B, C y D, se encontraron ubicados en regiones expuestas de la misma proteína. Al sustituir residuos que provocan estas mutaciones sobre la estructura, se predijo un aumento en la energía libre de Gibbs, indicando que la mutación podría provocar la desestabilización de la proteína, lo cual sugiere que estos cambios pueden tener un impacto importante sobre la misma, modificando su antigenicidad.

En lo que concierne la proteína F, los cambios que se identificaron en las zonas de hepta repetidos, se ubicaron en regiones expuestas. Cuando se realizó la sustitución de los aminoácidos involucrados en las mutaciones, se predijeron energías libre Gibbs positivas, sugiriendo la desestabilización de la proteína al presentar estos cambios. Estas mutaciones podrían afectar la interacción de la proteína F con la HN interfiriéndose con los cambios conformacionales en la proteína F para iniciar el proceso de fusión de membranas. Esto también podría contribuir a la variación en cuanto a la neurovirulencia de algunas cepas del virus.

El hecho de que no se hayan encontrado cambios en las secuencias de proteínas HN correspondientes a 9 de los genotipos, sugiere que esta proteína tiene un alto grado de conservación, apoyando a la hipótesis de que este virus es serológicamente monotípico, es decir, que la vacuna de un tipo de virus es capaz de proteger contra la infección generada con un virus distinto (Nojd *et al.*, 2001; Reid *et al.*, 2008). Sin embargo, se identificaron mutaciones importantes en las secuencias de las proteínas correspondientes a 4 genotipos (A, B, C y D), que se ubicaron en las regiones expuestas de la proteína y en zonas pertenecientes a los epítomos antigénicos. Se identificaron mutaciones en las cepas Jeryl-Lynn y UrabeAM9, que pertenecen a los genotipos A y B, respectivamente (Bonnet *et al.*, 2006). La vacuna Jeryl-Lynn se utiliza en los esquemas de vacunación en países como Estados Unidos, Canadá, Italia, Reino Unido y en Singapur; y en algunos de ellos se han reportado brotes de parotiditis con cepas de diversos genotipos como A, D, H y G en EUA; G y H en Canadá; H en Italia; C, D, E, G, K, F y J en Reino Unido y brotes con genotipo B en Singapur (tabla 3). Algunos de los países en los que se utiliza la vacuna Urabe AM9 son Japón, en donde se han informado brotes con cepas de genotipos, A, B, H, J, K, I y L; en Irlanda se han presentado casos con genotipos G y J (tabla 3). El hecho de que se presenten brotes por cepas del MuV con genotipos diferentes a los de las cepas vacunales y que se hayan identificado mutaciones importantes en regiones expuestas de la proteína HN de estos virus, hace pensar que no es recomendable seguir utilizando vacunas que empleen cepas de genotipos A o B, y sería conveniente hacer un análisis más extenso para determinar cuáles son los genotipos más estables para seleccionarlos como vacuna o inclusive elaborar una vacuna con una mezcla de cepas con genotipos distintos.

Como se ha mencionado, la clasificación de las distintas cepas del MuV basada en el gen SH solo es importante para la epidemiología de estas infecciones pero no es informativa con respecto a las propiedades antigénicas y de neurovirulencia de estos virus, tal como se observó en este trabajo. Así mismo, se identificaron mutaciones en la proteína HN que podrían modificar la antigenicidad de diferentes cepas virales, por lo que se sugiere la necesidad de una reclasificación basada en la proteína HN, la cual permitiría relacionar las propiedades antigénicas con la clasificación, y plantear las estrategias adecuadas para contar con una vacuna que genere una respuesta protectora contra los diversos tipos del MuV.

CONCLUSIONES

- El agrupamiento obtenido de las secuencias de las proteínas HN y F del MuV no correspondió totalmente al generado por clasificación basada en el gen SH.
- Se predijeron *in silico* las estructuras secundarias de las proteínas HN y F del MuV, encontrando que la estructura secundaria de la proteína HN resultó ser rica en láminas- β y la de la proteína F presentó una mayor proporción de α -hélices.
- Se identificaron varias mutaciones en los genotipos A, B, C y D que podrían afectar a las propiedades antigénicas y de neurovirulencia de las proteínas HN y F, las cuales se ubicaron en regiones expuestas de las estructuras tridimensionales de dichas proteínas obtenidas *in silico*.
- Los cambios identificados se presentaron principalmente en cepas de virus con genotipos A y B, que son los genotipos utilizados como vacunas, sugiriendo que estas cepas vacunales no son las más adecuadas para generar una respuesta inmune contra todos los genotipos virales.

PERSPECTIVAS

En este trabajo se identificaron mutaciones que podrían modificar las características antigénicas y de neurovirulencia de las proteínas HN y F del MuV, respectivamente. Estos cambios se ubicaron en regiones expuestas de las proteínas y se predijo *in silico* la desestabilización de la estructura de dichas proteínas al sustituir los aminoácidos involucrados estos cambios. Para confirmar estas predicciones, es necesario recurrir a métodos experimentales *in vitro* e *in vivo* para determinar si efectivamente las mutaciones identificadas en estas proteínas tienen un impacto sobre la antigenicidad y neurovirulencia de los MuV.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Afzal MA, Buchanan J, Heath AB, Minor PD. 1997. Clustering of mumps virus isolates by SH gene sequence only partially reflects geographical origin. *Arch Virol.* 142(2):227-38.
- Alirezaie B, Aghaiypour K, Shafiyi A. 2008. Genetic characterization of RS-12 (S-12), an Iranian isolate of mumps virus, by sequence analysis and comparative genomics of F, SH, and HN genes. *J Med Virol.* 80(4):702-10.
- Amexis G, Rubin S, Chizhikov V, Pelloquin F, Carbone K, Chumakov K. 2002. Sequence diversity of Jeryl Lynn strain of mumps virus: quantitative mutant analysis for vaccine quality control. *Virology.* 300(2):171-9.
- Atrasheuskaya AV, Blatum EM, Kulak MV, Atrasheuskaya A, Karpov IA, Rubin S, Ignatyev GM. 2007. Investigation of mumps vaccines failures in Minsk, Belarus, 2001-2003. *Vaccine.* 25:4651-4658.
- Atrasheuskaya AV, kulak MV, Rubin S, Ignatyev GM. 2007. Mumps vaccine failure investigation in Novosibirsk, Russia, 2002-2004. *Journal Compilation European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases.* 10:1-7.
- Batayneh N, Bdour S. 2002. Mumps: immune status of adults and epidemiology as a necessary background for choice of vaccination strategy in Jordan. *APMIS.* 110(7-8):528-34.
- Benson D A, Karsch-Mizrachi I, Lipman D J, Ostell J, Wheeler D L. 2006. GenBank. *Nucleic Acids Res.* 34: D16–D20 (Database issue).
- Boddicker JD, Rota PA, Kreman T, Wangeman A, Lowe L, Hummel KB, Thompson R, Bellini WJ, Pentella M, Desjardin L. 2007. Real-time reverse transcription-PCR assay for detection of mumps virus RNA in clinical specimens. *Clinical microbiology.* 45(9):2902-2908.
- Boga JA, de Oña M, Fernández-Verdugo A, González D, Morilla A, Arias M, Barreiro L, Hidalgo F, Melón S. 2008. Molecular identification of two genotypes of mumps virus causing two regional outbreaks in Asturias, Spain. *J Clin Virol.* 2008. 42(4):425-8.
- Bonnet MC, Dutta A, Weinberg C, Plotkin S A. 2006. Mumps Vaccine virus strains and aseptic meningitis. *Vaccine.* 30:1-9.
- Brockhoff HJ, Mollema L, Sonder GJ, Postema CA, van Binnendijk RS, Kohl RH, de Melker HE, Hahné SJ. 2010. Mumps outbreak in a highly vaccinated student population, The Netherlands, 2004. *Vaccine.* 28(17):2932-6.

Brown EG, Dimock K, Wright KE. 1996. The Urabe AM9 mumps vaccine is a mixture of viruses differing at amino acid 335 of the hemagglutinin-neuraminidase gene with one form associated with disease. *J Infect Dis.* 174(3):619-22.

Bryson K, McGuffin LJ, Marsden RL, Ward JJ, Sodhi JS, Jones DT. 2005. Protein structure prediction servers at University College London. *Nucl. Acids Res.* 33(Web Server issue):W36-38.

Carbone KM, Rubin S. 2007. Mumps virus. In *Fields Virology* (Knipe DM, Howley PM, eds) pp 1527-1542. Lippincott-Raven, Philadelphia, PA.

Clarke DK, Sidhu MS, Johnson JE, Udem SA. 2000. Rescue of mumps virus from cDNA. *J Virol.* 74(10):4831-8.

Cohen BJ, Jin L, Brown DWG, Kitson M. 1999. Infection with wild-type mumps virus in army recruits temporally associated with MMR vaccine. *Epidemiol Infect.* 123:251-5.

Combet C, Jambon M, Deléage G, Geourjon C. 2002. Geno3D: automatic comparative molecular modelling of protein. *Bioinformatics.* 18(1):213-4.

Crennell S, Takimoto T, Portner A, Taylor G. 2000. Crystal structure of the multifunctional paramyxovirus hemagglutinin-neuraminidase. *Nat Struct Biol.* 7(11):1068-74.

Cui A, Myers R, Xu W, Jin L. 2009. Analysis of the genetic variability of the mumps SH gene in viruses circulating in the UK between 1996 and 2005. *Infect Genet Evol.* 9(1):71-80.

Cusi MG, Bianchi S, Valassina M, Santini L, Valensin PE. 1995. Cloning and sequencing of the F gene of live attenuated Urabe Am9 mumps virus. *Gene.* 161(2):297-8.

Cusi MG, Fischer S, Sedlmeier R, Valassina M, Valensin PE, Donati M, Neubert WJ. 2001. Localization of a new neutralizing epitope on the mumps virus hemagglutinin-neuraminidase protein. *Virus Res.* 74(1-2):133-7.

DeLano WL. 2008. The PyMOL Molecular Graphics System. DaLano Scientific LLC, Palo Alto

Dutch RE, Leser GP, Lamb RA. 1999. Paramyxovirus fusion protein: characterization of the core trimer, a rod-shaped complex with helices in anti-parallel orientation. *Virology.* 254(1):147-59.

Echevarría JE, Castellanos A, Sanz JC, Pérez C, Palacios G, Martínez de Aragón MV, Peña Rey I, Mosquera M, de Ory F, Royuela E. 2010. Circulation of mumps virus genotypes in Spain from 1996 to 2007. *J Clin Microbiol.* 2010. 48(4):1245-54.

Edgar RC. 2004. MUSCLE: a multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity. *BMC Bioinformatics*. 5: 113.

Elango N, Varsanyi TM, Kövamees J, Norrby E. 1989. The mumps virus fusion protein mRNA sequence and homology among the paramyxoviridae proteins. *J Gen Virol*. 70 (Pt 4):801-7.

Elliott GD, Yeo RP, Afzal MA. 1990. Strainvariable editing during transcription of the P gene of mumps virus may lead to the generation of non-structural proteins NS1 (V) and NS2. *J Gen Virol*. 71(7):1555–1560.

Elliott,G.D., Afzal,M.A., Martin,S.J. and Rima,B.K. 1989. Nucleotide sequence of the matrix, fusion and putative SH protein genes of mumps virus and their deduced amino acid sequences. *Virus Res*. 12 (1): 61-75.

Eswar N, Marti-Renom MA, Webb B, M. Madhusudhan MS, Eramian D, Shen M, Pieper U, Sali.A. 2006 Comparative Protein Structure Modeling With MODELLER. *Bioinformatics*, John Wiley & Sons, Inc. 15:5.6.1-5.6.30.

Fiser A, Do RK, Sali A. 2000. Modeling of loops in protein structures. *Protein Science*. 9: 1753-1773.

Gabutti G, Guido M, Rota MC, De Donno A, Ciofi Degli Atti ML, Crovari P; Seroepidemiology Group. 2008. The epidemiology of mumps in Italy. *Vaccine*. 26(23):2906-11.

Holm L., Park J. 2000. DaliLite workbench for protein structure comparison. *Bioinformatics* 16: 566-567.

Huerta M, Davidovitch N, Aboudy Y, Ankol OE, Balicer RD, Zarka S, Grotto I. 2006. Declining population immunity to mumps among Israeli military recruits. *Vaccine*. 24:6300–6303.

Huppertz H I, Hall W W, ter Meulen V. 1977. Polypeptide composition of mumps virus. *Med Microbiol Immunol*. 27;163(4):251-9.

Hviid A, Rubin S, Muhlemann K. 2008. Mumps. *Seminars*. 371:932-44.

Inou Y, Nakayama T, Yoshida N, Uejima H, Yuri K, Kamada M, Kumagai T, Sakiyama H, Miyata A, Ochiai H, Ihara T, Okafuji T, Okafuji T, Nagai T, Suzuki E, Shimomura K, Ito Y, Miyazaki C. 2004. Molecular epidemiology of mumps virus in Japan and proposal of two new genotypes. *J Med Virol*. 73(1):97-104.

Ivancic J J, Santak m, Forcic D. 2008. Variability of hemagglutinin-neuraminidase and nucleocapsid protein of vaccine and wild-type mumps virus strains. *Infect. Genet. Evol.* Doi:10.1016/j.meegid.2008.04.007.

Ivancic J, Forcic D, Gulija TK, Zgorelec R, Repalust L, Baricevic M, Mesko-Prejac M, Mazuran R. 2004. Genetic characterization of a mumps virus isolate during passaging in the amniotic cavity of embryonated chicken eggs. *Virus Res.* 99(2):121-9.

Ivancic J, Gulija TK, Forcic D, Baricevic M, Jug R, Mesko-Prejac M, Mazuran R. 2005. Genetic characterization of L-Zagreb mumps vaccine strain. *Virus Res.* 109(1):95-105.

Jain E, Bairoch A, Duvaud S, Phan I, Redaschi N, Suzek B.E, Martin M.J, McGarvey P, Gasteiger E. 2009. Infrastructure for the life sciences: design and implementation of the UniProt website. *BMC Bioinformatics.* 10:136.

Jin L, Beard S, Brown DW. 1999. Genetic heterogeneity of mumps virus in the United Kingdom: identification of two new genotypes. *J Infect Dis.* 180(3):829-33.

Jin L, Brown DW, Litton PA, White JM. 2004. Genetic diversity of mumps virus in oral fluid specimens: application to mumps epidemiological study. *J Infect Dis.* 189(6):1001-8.

Jin L, Rima B, Orvell C, Tecele T, Afzal M, Uchida K, Nakayama T, Song JW, Kang C, Rota PA, Xu W, Featherstone D. 2005. Proposal for genetic characterization of wild-type mumps strains: preliminary standardization of the nomenclature. *Archives of Virology.* 150: 1903-1909.

Johansson B, Tecele T, Orvell C. 2002. Proposed criteria for classification of new genotypes of mumps virus. *Scand J Infect Dis.* 34(5):355-7.

Kashiwagi Y, Takami T, Mori T, Nakayama T. 1999. Sequence analysis of F, SH, and HN genes among mumps virus strains in Japan. *Arch Virol.* 144(3):593-9.

Kim SH, Song KJ, Shin YK, Kim JH, Choi SM, Park KS, Baek LJ, Lee YJ, Song JW. 2000. Phylogenetic analysis of the small hydrophobic (SH) gene of mumps virus in Korea: identification of a new genotype. *Microbiol Immunol.* 44(3):173-7.

Kövamees J, Rydbeck R, Orvell C, Norrby E. 1990. Hemagglutinin-neuraminidase (HN) amino acid alterations in neutralization escape mutants of Kilham mumps virus. *Virus Res.* 17(2):119-29.

Kubota T, Yokosawa N, Yokota S, Norrby E. 2001. C terminal CYS-RICH region of mumps virus structural V protein correlates with block of interferon alpha and gamma signal transduction pathway through decrease of STAT 1-alpha. *Biochem Biophys Res Commun.* 283:255–259.

Künkel U, Schreier E, Siegl G, Schultze D. 1994. Molecular characterization of mumps virus strains circulating during an epidemic in eastern Switzerland 1992/93. *Arch Virol.* 136(3-4):433-8.

Kulkarni-Kale U, Ojha J, Manjari GS, Deobagkar DD, Mallya AD, Dhere RM, Kapre SV. 2007. Mapping antigenic diversity and strain specificity of mumps virus: a bioinformatics approach. *Virology*. 15;359(2):436-46.

Laskowski R A, MacArthur M W, Moss D S & Thornton J M. 1993. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J. Appl. Cryst.* 26: 283-291.

Lawrence MC, Borg NA, Streltsov VA, Pilling PA, Epa VC, Varghese JN, McKimm-Breschkin JL, Colman PM. 2004. Structure of the haemagglutinin-neuraminidase from human parainfluenza virus type III. *J Mol Biol.*335(5):1343-57.

Lee JY, Kim YY, Shin GC, Na BK, Lee JS, Lee HD, Kim JH, Kim WJ, Kim J, Kang C, Cho HW. 2003. Molecular characterization of two genotypes of mumps virus circulated in Korea during 1998-2001. *Virus Res.* 97(2):111-6.

Lemon K, Rima B K, McQuaid S, Ingrid V A, Duprex W P. 2007. The F gene of rodent brain-adapted Mumps virus is a major determinant of neurovirulence. *Journal of Virology.* 81(15):8293-8302.

Lesk AM. 2002. Protein Structure and Drug Discovery. In *Introduction to Bioinformatics*. Oxford University Press Inc. pp 229-232 . New York, Unated States.

Lim CS, Chan KP, Goh KT, Chow VT. 2003. Hemagglutinin-neuraminidase sequence and phylogenetic analyses of mumps virus isolates from a vaccinated population in Singapore. *J Med Virol.* 70(2):287-92.

Ma S, Zhang R, Liu L, Wang J, Wang L, Yang W, Liang Y, Yang Z, Li O. 2006. Sequence analysis of the SH gene and flanking region of mumps virus isolated strain (strain SP). *Microbes Infect.* In press.

Martin AC, Facchiano AM, Cuff AL, Hernandez-Boussard T, Olivier M, Hainaut P, Thornton JM. 2002. Integrating mutation data and structural analysis of the TP53 tumor-suppressor protein. *Hum Mutat.* 19(2):149-64.

Marti-Renom MA, Stuart A, Fiser A, Sánchez R, Melo F, Sali A. 2000. Comparative protein structure modeling of genes and genomes. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 29: 291-325.

Montes M, Cilla G, Artieda J, Vicente D, Basterretxea M. 2002. Mumps outbreak in vaccinated children in Gipuzkoa (Basque Country), Spain. *Epidemiol Infect.* 129(3):551-6.

Nicholas K B, Nicholas H B Jr and Deerfield D W II. 1997 *GeneDoc: Analysis and Visualization of Genetic Variation*. Embnew News. 4:14

Nojd J, Teclé T, Samuelsson A, Orvell C. 2001. Mumps virus neutralizing antibodies do not protect against reinfection with a heterologous mumps virus genotype. *Vaccine*. 19:1727 – 1731.

Okazaki K, Tanabayashi K, Takeuchi K, Hishiyama M, Okazaki K, Yamada A. 1992. Molecular cloning and sequence analysis of the mumps virus gene encoding the L protein and the trailer sequence. *Virology*. 188(2):926-30.

Örvell C, Kalantari M, Johansson B. 1997. Characterization of five conserved genotypes of the mumps virus small hydrophobic (SH) protein gene. *J Gen Virol*. 78 (Pt 1):91-5.

Örvell C, Teclé T, Johansson B, Saito H, Samuelson A. 2002. Antigenic relationships between six genotypes of the small hydrophobic protein gene of mumps virus. *J Gen Virol*. 83(Pt 10):2489-96.

Palacios G, Jabado O, Cisterna D, de Ory F, Renwick N, Echevarria JE, Castellanos A, Mosquera M, Freire MC, Campos RH, Lipkin WI. 2005. Molecular identification of mumps virus genotypes from clinical samples: standardized method of analysis. *J Clin Microbiol*. 43(4):1869-78.

Palacios G, Rodriguez C, Cisterna D, Freire M C, Cello G. 2000. Nested PCR for rapid detection of mumps virus in cerebrospinal fluid from patients with neurological diseases. *Journal of Clinical Microbiology*. 38(1):274-278.

Paterson RG, Lamb RA. 1990. RNA editing by G-nucleotide insertion in mumps virus P-gene mRNA transcripts. *J Virol*. 64:4137-4145.

Ramachandran GN, Ramakrishnan C, Sasasekharan V. 1963. Stereochemistry of polypeptide chain configuration. *J. Mol. Biol*. 7: 95–9.

Reid F, Hassan J, Irwin F, Waters A, Hall W, Connell J. 2008. Epidemiologic and diagnostic evaluation of a recent mumps outbreak using oral fluid samples. *Journal of clinical Virology*. 41:134-137.

Rubin SA, Amexis G, Pletnikov M, Li Z, Vanderzanden J, Mauldin J, Sauder C, Malik T, Chumakov K, Carbone KM. 2003. Changes in mumps virus gene sequence associated with variability in neurovirulent phenotype. *J Virol*. 77(21):11616-24.

Saito H, Takahashi Y, Harata S, Tanaka K, Sano T, Suto T, Yamada A, Yamazaki S, Morita M. 1996. Isolation and characterization of mumps virus strains in a mumps outbreak with a high incidence of aseptic meningitis. *Microbiol Immunol*. 40(4):271-5.

Saitou N, Nei M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees". *Mol Biol Evol*. 4 (4):406–425.

Sali A, Blundell TL. 1993. Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. *J Mol Biol.* 234(3):779-815.

Santak M, Kosutić-Gulija T, Tesović G, Ljubin-Sternak S, Gjenero-Margan I, Betica-Radić L, Forčić D. 2006. Mumps virus strains isolated in Croatia in 1998 and 2005: Genotyping and putative antigenic relatedness to vaccine strains. *J Med Virol.* 78(5):638-43.

Santos CL, Ishida MA, Foster PG, Sallum MA, Benega MA, Borges DB, Correa KO, Constantino CR, Afzal MA, Paiva TM. 2008. Detection of a new mumps virus genotype during parotitis epidemia of 2006-2007 in the state of Sao Paulo, Brazil. *Medical Virology.* 80:323-329.

Santos CL, Ishida MA, Foster PG, Sallum MA, Benega MA, Borges DB, Corrêa KO, Constantino CR, Afzal MA, Paiva TM. 2008. Detection of a new mumps virus genotype during parotitis epidemic of 2006-2007 in the state of São Paulo, Brazil. *J Med Virol.* 80(2):323-9.

Santos-López G, Scior T, Borraz-Argüello Mdel T, Vallejo-Ruiz V, Herrera-Camacho I, Tapia-Ramírez J, Reyes-Leyva J. 2009. Structure-function analysis of two variants of mumps virus hemagglutinin-neuraminidase protein. *Braz J Infect Dis.* 13(1):24-34.

Shah D, Vidal S, Link MA, Rubin SA, Wright KE. 2009. Identification of genetic mutations associated with attenuation and changes in tropism of Urabe mumps virus. *J Med Virol.* 81(1):130-8.

Ströhle A, Bernasconi C, Germann D. 1996. A new mumps virus lineage found in the 1995 mumps outbreak in western Switzerland identified by nucleotide sequence analysis of the SH gene. *Arch Virol.* 141(3-4):733-41.

Takeuchi K, Tanabayashi K, Hishiyama M, Yamada A, Sugiura A. 1989. Cloning and sequencing of the fusion protein gene of mumps virus (Miyahara strain). *Nucleic Acids Res.* 17(14):5839.

Takeuchi K, Tanabayashi K, Hishiyama M, Yamada A, Sugiura A. 1991. Variations of nucleotide sequences and transcription of the SH gene among mumps virus strains. *Virology.* Mar;181(1):364-6.

Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution.* 24:1596-1599.

Tanabayashi K, Takeuchi K, Okazaki K, Hishiyama M, Yamada A. 1992. Expression of mumps virus glycoproteins in mammalian cells from cloned cDNAs: both F and HN proteins are required for cell fusion. *Virology.* 187(2):801-4.

Teclé T, Böttiger B, Orvell C, Johansson B. 2001. Characterization of two decades of temporal co-circulation of four mumps virus genotypes in Denmark: identification of a new genotype. *J Gen Virol.* 82(Pt 11):2675-80.

Teclé T, Johansson B, Jecic A, Forsgren M, Orvell C. 1998. Characterization of three co-circulating genotypes of the small hydrophobic protein gene of mumps virus. *J Gen Virol.* 79 (Pt 12):2929-37.

Teclé T, Johansson B, Yun Z, Orvell C. 2000. Antigenic and genetic characterization of the fusion (F) protein of mumps virus strains. *Arch Virol.* 145(6):1199-210.

Teclé T, Mickiené A, Johansson B, Lindquist L, Orvell C. 2002. Molecular characterisation of two mumps virus genotypes circulating during an epidemic in Lithuania from 1998 to 2000. *Arch Virol.* 147(2):243-53.

Tillieux SL, Halsey WS, Sathé GM, Vassilev V. 2009. Comparative analysis of the complete nucleotide sequences of measles, mumps, and rubella strain genomes contained in Priorix-Tetra and ProQuad live attenuated combined vaccines. *Vaccine.* 6;27(16):2265-73.

Uchida K, Shinohara M, Shimada S, Segawa Y, Hoshino Y. 2001. Characterization of mumps virus isolated in saitama prefecture, Japan, by sequence analysis of the SH gene. *Microbiol Immunol.* 45(12):851-5.

Uchida K, Shinohara M, Shimada S, Segawa Y, Kimura K, Hoshino Y. 2003. Characterization of the F gene of contemporary mumps virus strains isolated in Japan. *Microbiol Immunol.* 47(2):167-72.

Uchida K, Shinohara M, Shimada S, Segawa Y, Hoshino Y. 2001. Characterization of mumps virus isolated in Saitama Prefecture, Japan, by sequence analysis of the SH gene. *Microbiol. Immunol.* 45(12):851-855.

Utz S, Richard JL, Capaul S, Matter HC, Hrisoho MG, Mühlemann K. 2004. Phylogenetic analysis of clinical mumps virus isolates from vaccinated and non-vaccinated patients with mumps during an outbreak, Switzerland 1998-2000. *J Med Virol.* 73(1):91-6.

Watson-Creed G, Saunders A, Scott J, Lowe L, Pettipas J, Hatchette TF. 2006. Two successive outbreaks of mumps in Nova Scotia among vaccinated adolescents and young adults. *CMAJ.* 175(5):483-8.

Waxham MN, Server AC, Goodman HM, Wolinsky JS. 1987. Cloning and sequencing of the mumps virus fusion protein gene. *Virology.* 159(2):381-8.

Wilson R, Fuentes S M, Wang P, Taddeo E C, Klatt A, Henderson A J, He B. 2006. Function of small hydrophobic proteins of paramyxovirus. *Journal of Virology.* 80:1700-1709.

Xia X, and Xie Z. 2001 DAMBE: Data analysis in molecular biology and evolution. *Journal of Heredity*. 92:371-373.

Yates PJ, Afzal MA, Minor PD. 1996. Antigenic and genetic variation of the HN protein of mumps virus strains. *J Gen Virol*. 77 (Pt 10):2491-7.

Yeo RP, Afzal MA, Forsey T, Rima BK. 1993. Identification of a new mumps virus lineage by nucleotide sequence analysis of the SH gene of ten different strains. *Arch Virol*. 128(3-4):371-7.

Yin HS, Wen X, Paterson RG, Lamb RA, Jardetzky TS. 2006. Structure of the parainfluenza virus 5 F protein in its metastable, prefusion conformation. *Nature*. 439(7072):38-44.

Yuan P, Thompson TB, Wurzburg BA, Paterson RG, Lamb RA, Jardetzky TS. 2005. Structural studies of the parainfluenza virus 5 hemagglutinin-neuraminidase tetramer in complex with its receptor, sialyllactose. *Structure*. 13(5):803-15.

Zaitsev V, Von Itzsteine M, Groves D. 2004. Second sialic acid binding site in Newcastle disease virus hemagglutinin-neuraminidase: implications in fusion. *J Virol*. 78:3733-3741.

<http://babylone.ulb.ac.be/popmusic/index.php>

<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins>

<http://expasy.org/viralzone/>

<http://www.cdc.gov/mumps/about/photos.html>

<http://www.pdb.org/pdb/home/home.do>

<http://www.who.int/immunization/policy/mumps.pdf>

http://www.who.int/immunization_monitoring/diseases/mumps/en/index.html

APÉNDICE

I. Secuencias de los genes SH, HN y F del MuV que se obtuvieron en el GenBank.

Tabla 1. Secuencias de los genes HN, F, SH del MuV obtenidas en el Gen Bank con genotipo A según el gen SH.

HN	F	SH
1.AF201473 JL Clarke et al., 2000	1.AF143392 Kilham Teclé et al., 2000	1.AF201473 * JL Clarke et al., 2000
2. AF338106 JL5 Amexis et al., 2002	2. AF143393 Enders Teclé et al., 2000	2. AF338106 * JL5 Amexis et al., 2002
3. AF345290 JL2 Amexis et al., 2002	3. AF143395 SBL-1 Teclé et al., 2000	3. AF345290 * JL2 Amexis et al., 2002
4. AY502062 KILHAM	4. AF201473 JL Clarke et al., 2000	4. AY735438 * LP4 Palacios et al., 2005
5. AY584603 JL-5 Kulkarni et al., 2007	5. AF338106 JL5 Amexis et al., 2002	5. AY735439 * LP71 Palacios et al., 2005
6. AY584604 JL-2 vacuna Kulkarni et al., 2007	6. AF345290 JL2 Amexis et al., 2002	6. AY735440 * SF65 Palacios et al., 2005
7. EF493026 Kilham	7. AJ133693 JL-5	7. AY735441 * 570LCR Palacios et al., 2005
8. FJ211584 RIT4385 Tillieux et al., 2009.	8. AJ133694 Enders	8. D00663 * SBL-1 Elliot et al., 1989
9. FJ211585 RIT4385 Tillieux et al., 2009.	9. D00663 SBL1 Elliot et al., 1989	9. D90231 * Enders Takeuchi,K., et al., 1991
10. FJ211586 JL1 Tillieux et al., 2009	10. EF493024 Kilham	10. D90232 * Jeryl-Lynn Takeuchi et al., 1991
11. M55065 SBL-1 Kovamees et al., 1989	11. FJ211584 RIT4385	11. EF493025 * Kilham
12. U37758 Rubini	12. FJ211585 RIT4385	12. FJ211584 * RIT4385 Tillieux et al., 2009.
13. X93176 Enders Yates et al., 1996	13. FJ211586 JL1 Tillieux et al., 2009	13. FJ211585 * RIT4385 Tillieux et al., 2009.
14. X93178 JL-2 Yates et al., 1996		14. FJ211586 * JL1 Tillieux et al., 2009
15. X93179 JL-5 Yates et al., 1996		15. U50283 * SE4098 Orvell et al., 1997
16. X93180 Rubini Yates et al., 1996		16. X63704 * SBL1 Yeo et al., 1993
		17. X63705 * END Yeo et al., 1993
		18. X63706 * KILHAM Yeo et al., 1993
		19. X63707 *

		Jeryl Lynn Yeo et al., 1993
		20. X72944 * Rubini vacuna Kunkel et al., 1994

*Se presentan el número de acceso de la secuencia, el nombre de la cepa y la referencia bibliográfica de donde se obtuvo el genotipo.

Tabla 2. Secuencias de los genes HN, F, SH del MuV obtenidas en el Gen Bank con genotipo B según el gen SH.

HN	F	SH
1. AB003412 MP76-S Kashiwagi et al., 1999	1. AB003412 MP76-S Kashiwagi et al., 1999	1. AB003412 * MP76-S Kashiwagi et al., 1999
2. AB003413 MP-77-M Kashiwagi et al., 1999	2. AB003413 MP-77-M Kashiwagi et al., 1999	2. AB003413 * MP-77-M Kashiwagi et al., 1999
3. AB003416-B MP-85-S Kashiwagi et al., 1999	3. AB003416 MP-85-S Kashiwagi et al., 1999	3. AB003416 * MP-85-S Kashiwagi et al., 1999
4. AB003418 MP-89-OI Kashiwagi et al., 1999	4. AB003418 MP-89-OI Kashiwagi et al., 1999	4. AB003418 * MP-89-OI Kashiwagi et al., 1999
5. AB003419 MP-89-OS Kashiwagi et al., 1999	5. AB003419 MP-89-OS Kashiwagi et al., 1999	5. AB003419 * MP-89-OS Kashiwagi et al., 1999
6. AB003420 MP-80-M Kashiwagi et al., 1999	6. AB003420 MP-80-M Kashiwagi et al., 1999	6. AB003420 * MP-80-M Kashiwagi et al., 1999
7. AB003421 MP-77-T Kashiwagi et al., 1999	7. AB003421 MP-77-T Kashiwagi et al., 1999	7. AB003421 * MP-77-T Kashiwagi et al., 1999
8. AB003422 MP-89-K Kashiwagi et al., 1999	8. AB003422 MP-89-K Kashiwagi et al., 1999	8. AB003422 * MP89-K Kashiwagi et al., 1999
9. AB003423 MP-80-J Kashiwagi et al., 1999	9. AB003423 MP-80-J Kashiwagi et al., 1999	9. AB003423 * MP-80-J Kashiwagi et al., 1999
10. AB003425 MP-77-SA Kashiwagi et al., 1999	10. AB003425 MP-77-SA Kashiwagi et al., 1999	10. AB003425 * MP-77-SA Kashiwagi et al., 1999
11. AB003426 MP-77-SU Kashiwagi et al., 1999	11. AB003426 MP-77-SU Kashiwagi et al., 1999	11. AB003426 * MP-77-SU Kashiwagi et al., 1999
12. AB040874 Miyahara Okazaki et al., 1992	12. AB040874 Miyahara Okazaki et al., 1992	12. AB040874 * Miyahara Okazaki et al., 1992
13. AB470486 Hoshino	13. AB470486 Hoshino	13. AB056146 * TK220/Ja97 Uchida et al., 2001
14. AF314558 SIPAR 02 Amexis et al., 2001	14. AF314558 SIPAR02 Amexis et al., 2001	14. AB056149 * SA352/Ja97 Uchida et al., 2001
15. AF314559 Urabe vacunaSmith-Kline Beecham Amexis et al., 2001	15. AF314559 Urabe vacuna Smith-Kline Beecham Amexis et al., 2001	15. AB105472 * Himeji 89/JPN.00 Inou et al., 2004
16. AF314560 871004 Amexis et al., 2001	16. AF314560 871004 Amexis et al., 2001	16. AB105473 * Himeji 303/JPN.00 Inou et al., 2004
17. AF314561 Biken Amexis et al., 2001	17. AF314561 Biken Amexis et al., 2001	17. AB205226 * TK671/Ja98 Uchida et al., 2001
18. AF314562 871005	18. AF314562 871005	18. AB470486 * Hoshino

Amexis et al., 2001	Amexis et al., 2001	
19. AF448527 4829 Lim et al., 2003	19. FJ375177 Urabe 1004-10/2 Shah et al., 2009	19. AF314558 * SIPAR 02 Amexis et al., 2001
20. AF448528 4972 Lim et al., 2003	20. NC_002200 Miyahara Referencia NCBI Genome Project	20. AF314559 * Urabe vacuna Smith-Kline Beecham Amexis et al., 2001
21. AF448529 4990 Lim et al., 2003	21. X15285 Miyahara vacuna Takeuchi et al., 1989	21. AF314560 * 87 1004 Amexis et al., 2001
22. AF448530 4991 Lim et al., 2003	22. X82887 UrabeAm9 clonaBS-F Cusi et al., 1995	22. AF314561 * Biken Amexis et al., 2001
23. AF448531 5011 Lim et al., 2003		23. AF314562 * 87 1005 Amexis et al., 2001
24. AF448532 5012 Lim et al., 2003		24. AM293338 * MuVs-PAL04-89033-B putative
25. AF448533 5192 Lim et al., 2003		25. D90233 * Matsuyama Takeuchi et al., 1991
26. AF448534 4971 Lim et al., 2003		26. D90234 * Miyahara vacuna Takeuchi et al., 1991
27. FJ375177 Urabe 1004-10/2 Shah et al., 2009		27. D90235 * Takahashi Takeuchi et al., 1991
28. NC_002200 Miyahara Referencia NCBI Genome Project		28. D90236 * Urabe silvestre Takeuchi et al., 1991
29. X15284 Miyahara vacuna Takeuchi et al., 1989		29. FJ375177 * Urabe 1004-10/2 Shah et al., 2009
30. X93181 Urabe vacuna Yates et al., 1996		30. NC_002200 * Miyahaya Referencia NCBI
31. X99040 UrabeAM9 Brown et al., 1996		31. U50295 * JPfm93 Orvell et al., 1997
32. X99041 871004UrabeAM9 Brown et al., 1996		32. U50296 * JPmk1 Orvell et al., 1997
		33. U50297 * JPys5 Orvell et al., 1997
		34. U50298 * JPws2 Orvell et al., 1997
		35. U50299 * JPwv3 Orvell et al., 1997
		36. Y08216 * Po26s/Portugal/96 Afzal et al., 1997

*Se presentan el número de acceso de la secuencia, el nombre de la cepa y la referencia bibliográfica de donde se obtuvo el genotipo.

Tabla 3. Secuencias de los genes HN, F, SH del MuV obtenidas en el Gen Bank con genotipo C según el gen SH.

HN	F	SH
1. AY502057 Lit-1023	1. AF143388 V27 Teclé et al, 2000.	1. AF365890 * DK/80/04 Teclé et al., 2001
2. AY502058 Lit-1013	2. AF143389 V29 Teclé et al, 2000.	2. AF365892 * DK/82/01 Teclé et al., 2001
3. AY502059 Lit-976	3. AF143390 V31 Teclé et al, 2000.	3. AF365896 * DK/82/05 Teclé et al., 2001
4. AY502060 Lit-957	4. AF143391 V34 Teclé et al, 2000.	4. AF365898 * DK/82/07 Teclé et al., 2001
5. AY669145 Drag94	5. AY502055 Lit-957	5. AF365900 * DK/83/01 Teclé et al., 2001
6. DQ139782 9218/Zg98 Santak et al., 2006	6. AY502056 Lit-1013	6. AF365902 * DK/84/01 Teclé et al., 2001
7. EU370206 9218/Zg98	7. AY502061 Lit-976	7. AF365909 * DK/96/04 Teclé et al., 2001
8. U37760 YLB92 Strohle,A., et al., 1996	8. AY669145 Drag94	8. AF365925 * DK/89/01 Teclé et al., 2001
	9. EU370206 9218/Zg98	9. AF526398 * 748391_SHG Utz et al., 2004
		10. AF526399 * 757329_SHG Utz et al., 2004
		11. AF526400 * 620731_SHG Utz et al., 2004
		12. AF526401 * 801554_SHG Utz et al., 2004
		13. AF526402 * 751331_SHG Utz et al., 2004
		14. AF526403 * 696640_SHG Utz et al., 2004
		15. AF526404 * 689567_SHG Utz et al., 2004
		16. AF526405 * 819170_SHG Utz et al., 2004
		17. AF526406 * 763127_SHG Utz et al., 2004
		18. AF526407 * 779091_SHG Utz et al., 2004
		19. AF526408 * 620568_SHG Utz et al., 2004
		20. AJ272364 * 9218/Zg98 Santak et al., 2006
		21. AY039715 * Lit527 Teclé et al., 2002
		22. AY039716 *

		Lit617 Teclé et al., 2002
		23. AY039717 * Lit655 Teclé et al., 2002
		24. AY039718 * Lit762 Teclé et al., 2002
		25. AY039719 * Lit1016 Teclé et al., 2002
		26. AY039720 * Lit1022 Teclé et al., 2002
		27. AY039721 * Lit1023 Teclé et al., 2002
		28. AY039722 * Lit1035 Teclé et al., 2002
		29. AY039725 * Lit934 Teclé et al., 2002
		30. AY039726 * Lit948 Teclé et al., 2002
		31. AY039727 * Lit957 Teclé et al., 2002
		32. AY039728 * Lit958 Teclé et al., 2002
		33. AY039729 * Lit959 Teclé et al., 2002
		34. AY039730 * Lit976 Teclé et al., 2002
		35. AY039731 * Lit983 Teclé et al., 2002
		36. AY039733 * Lit985 Teclé et al., 2002
		37. AY039734 * Lit989 Teclé et al., 2002
		38. AY039735 * Lit1003 Teclé et al., 2002
		39. AY039736 * Lit1013 Teclé et al., 2002
		40. AY039737 * Lit1017 Teclé et al., 2002
		41. AY039738 * Lit1065 Teclé et al., 2002
		42. AY039739 * Lit789 Teclé et al., 2002
		43. AY039740 * Lit935 Teclé et al., 2002
		44. AY039741 * Lit982 Teclé et al., 2002
		45. AY380062 *

		UK98-162x22 Jin et al., 2004
		46. AY380063 * UK98-192x8 Jin et al., 2004
		47. EU370206 * 9218/Zg98
		48. U35847 * MO92 Strohle et al., 1996
		49. U35848 * YLB92 Strohle,A., et al., 1996
		50. U50285 * SEv31 Orvell et al., 1997
		51. U50286 * SEv34 Orvell et al., 1997
		52. U50287 * SEv29 Orvell et al., 1997
		53. U50292 * SEv27 Orvell et al., 1997
		54. X63709 * BELFAST Yeo et al., 1993
		55. X63713 * Bristol Yeo et al., 1993
		56. Y08213 * Po6s/Portugal/96 Afzal et al., 1997
		57. Y08214 * Po10s/Portugal/96 Afzal et al., 1997
		58. Y08217 * Po40s/Portugal/96 Afzal et al., 1997
		59. Y14297 * Drag94

*Se presentan el número de acceso de la secuencia, el nombre de la cepa y la referencia bibliográfica de donde se obtuvo el genotipo.

Tabla 4. Secuencias de los genes HN, F, SH del MuV obtenidas en el Gen Bank con genotipo D según el gen SH.

HN	F	SH
1. AY376470 ZgA/Cro69 Ivancic et al., 2004	1. AF143383 V1 Teclé et al, 2000.	1. AF365883 * DK/79/01 Teclé et al., 2001
2. EU259203 Zg/CRO06 Ivancic et al., 2008	2. AF143384 V4 Teclé et al, 2000.	2. AF365884 * DK/79/02 Teclé et al., 2001
3. M19933 RW Waxham et al., 1988	3. AF143386 V7 Teclé et al, 2000.	3. AF365885 * DK/79/03 Teclé et al., 2001
4. X98874 London-1	4. AF143387 V8 Teclé et al, 2000.	4. AF365886 * DK/79/04 Teclé et al., 2001
5. X98875 Europe-1	5. AY376470 ZgA/Cro69 Ivancic et al., 2004	5. AF365887 * DK/80/01 Teclé et al., 2001

	6. M17142 RW Waxham et al., 1988	6. AF365888 * DK/80/02 Teclé et al., 2001
		7. AF365889 * DK/80/03 Teclé et al., 2001
		8. AF365893 * DK/82/02 Teclé et al., 2001
		9. AF365895 * DK/82/04 Teclé et al., 2001
		10. AF365899 * DK/82/08 Teclé et al., 2001
		11. AF365903 * DK/96/02 Teclé et al., 2001
		12. AF365904 * DK/97/03 Teclé et al., 2001
		13. AF365905 * DK/98/03 Teclé et al., 2001
		14. AF365906 * DK/97/02 Teclé et al., 2001
		15. AF365907 * DK/97/01 Teclé et al., 2001
		16. AF365908 * DK/96/03 Teclé et al., 2001
		17. AF365910 * DK/96/01 Teclé et al., 2001
		18. AF365911 * DK/98/01 Teclé et al., 2001
		19. AF365912 * DK/97/04 Teclé et al., 2001
		20. AF365913 * DK/98/04 Teclé et al., 2002
		21. AF365914 * DK/98/02 Teclé et al., 2001
		22. AF365915 * DK/99/02 Teclé et al., 2001
		23. AF365916 * DK/99/01 Teclé et al., 2001
		24. AM420301 ESO6-AHx1
		25. AY039723 * Lit788 Teclé et al., 2001
		26. AY039732 * Lit984 Teclé et al., 2001
		27. AY299130 * Sp9 Palacios et al., 2005
		28. AY376470 * ZgA/Cro69 Ivancic et al., 2004
		29. AY735420 *

		M341 Palacios et al., 2005
		30. AY735421 * 47-98 Palacios et al., 2005
		31. AY735422 * 528SAL Palacios et al., 2005
		32. AY735423 * 527SER Palacios et al., 2005
		33. AY735424 * SF58 Palacios et al., 2005
		34. AY735425 * LP42 Palacios et al., 2005
		35. AY735426 * M420 Palacios et al., 2005
		36. AY735427 * M380 Palacios et al., 2005
		37. AY735428 * M421 Palacios et al., 2005
		38. AY735429 * 538-00 Palacios et al., 2005
		39. AY735430 * 215-97 Palacios et al., 2005
		40. AY735431 * SF52 Palacios et al., 2005
		41. AY735432 * 297-97 Palacios et al., 2005
		42. AY735433 * 21-98 Palacios et al., 2005
		43. AY735434 * SF57 Palacios et al., 2005
		44. AY735435 M4
		45. AY735436 * M5 Palacios et al., 2005
		46. AY735437 * SF47 Palacios et al., 2005
		47. EU259202 * Zg/CRO06 Ivancic et al., 2008
		48. U50181 * SEv3 Orvell et al., 1997
		49. U50182 SEv4 Orvell et al., 1997
		50. U50281 * SEv35 Orvell et al., 1997
		51. U50282 * Orvell et al., 1997 SEv5
		52. U50284 * SE50647

		Orvell et al., 1997
		53. U50288 * SE26068 Orvell et al., 1997
		54. U50289 * SEv1 Orvell et al., 1997
		55. U50290 * SEv10 Orvell et al., 1997
		56. U50291 * SEv11 Orvell et al., 1997
		57. U50293 * SEv28 Orvell et al., 1997
		58. U50294 * SEv33 Orvell et al., 1997
		59. X63708 * RW Yeo et al., 1993
		60. Y08212 * Po3s/Portugal/96 Afzal et al., 1997

*Se presentan el número de acceso de la secuencia, el nombre de la cepa y la referencia bibliográfica de donde se obtuvo el genotipo.

Tabla 5. Secuencias de los genes HN, F, SH del MuV obtenidas en el Gen Bank con genotipo E según el gen SH.

HN	F	SH
		1.X63710 * Edinburgh4 Yeo et al., 1993
		2. X63711 Ref * Edinburgh2 Yeo et al., 1993
		3. X63712 * Edinburgh6 Yeo et al., 1993

*Se presentan el número de acceso de la secuencia, el nombre de la cepa y la referencia bibliográfica de donde se obtuvo el genotipo.

Tabla 6. Secuencias de los genes HN, F, SH del MuV obtenidas en el Gen Bank con genotipo F según el gen SH.

HN	F	SH
1.DQ649478 SP Ma et al., 2006	1.DQ649478 SP Ma et al., 2006	1.AY380065 * UK99-102x13 Jin et al., 2004
2.EU884413 SP	2. EU884413 SP	2. AY380068 * UK99-190 Jin et al., 2004
		3. DQ649478 *

		SP Ma,S., et al., 2006
		4. EF102875 * Zhejiang 06-26-07 NCBI
		5. EF102876 * Zhejiang 06-10-01 NCBI
		6. EF102877 * Zhejiang 06-26-08 NCBI
		7. EF102878 * Zhejiang 06-26-09 NCBI
		8. EF102879 * Zhejiang 06-11-02 NCBI
		9. EF102880 * Zhejiang 06-30-10 NCBI
		10. EU780217 * MuVs-CHN04-4B050505-F Cui et al., 2009
		11. EU780218 * MuVs-CHN04-4B060742-F Cui et al., 2009
		12. EU780219 * MuVs-CHN04-4B070203-F Cui et al., 2009
		13. EU780220 * MuVs-CHN04-4B062103-F Cui et al., 2009
		14. EU780221 * MuVi-CHN05-SD9-F Cui et al., 2009
		15. EU780222 * MuVi-CHN05-SD11-F Cui et al., 2009
		16. EU884413 * SP
		17. U80435 * Wsh3 Yeo et al., 1993
		18. Z77158 * Wlz1 Yeo et al., 1993
		19. Z77159 * Wlz3 Yeo et al., 1993
		20. Z77160 * Wsh1 Yeo et al., 1993
		21. Z77161 * Wlz2 Yeo et al., 1993
		22. Z81005 * Wsh2 Yeo et al., 1993

*Se presentan el número de acceso de la secuencia, el nombre de la cepa y la referencia bibliográfica de donde se obtuvo el genotipo.

Tabla 7. Secuencias de los genes HN, F, SH del MuV obtenidas en el Gen Bank con genotipo G según el gen SH.

HN	F	SH
1. AF280799 Glouc1/UK96 Jin et al., 2000 Santak, et al., 2006	1. AB085216 SA702/Ja99 Uchida et al., 2003	1. AB056141 * SA841/Ja00 Uchida et al., 2001
2. DQ139783 Du/CRO05 Santak et al., 2006	2. AB085217 SA369/Ja00 Uchida et al., 2003	2. AB056142 * SA456/Ja00 Uchida et al., 2001
3. EU370207 Du/CRO05 Santak et al., 2006	3. AB085218 SA456/Ja00 Uchida et al., 2003	3. AB056143 * SA369/Ja00 Uchida et al., 2001
	4. AB085219 SA956/Ja00 Uchida et al., 2003	4. AB056145 * SA702/Ja99 Uchida et al., 2001
	5. AB085220 SA963/Ja00 Uchida et al., 2003	5. AB105476 * Sapporo K-76/JPN.01 Inou et al., 2004
	6. AB085221 SA996/Ja00 Uchida et al., 2003	6. AB105477 * Sapporo N-3/JPN.00 Inou et al., 2004
	7. AB085222 SA208/Ja01 Uchida et al., 2003	7. AB105478 * Tokyo M-21/JPN.00 Inou et al., 2004
	8. AB085223 SA718/Ja01 Uchida et al., 2003	8. AB105481 * Takamatsu 121/JPN.01 Inou et al., 2004
	9. AB085224 SA856/Ja01 Uchida et al., 2003	9. AB105482 * Yamaguchi 99/JPN.00 Inou et al., 2004
	10. AB085225 SA925/Ja01 Uchida et al., 2003	10. AB115970 * 10879/00 Palacios et al., 2005
	11. AF280799 Glouc1/UK96 Jin et al., 2000 Santak, et al., 2006	11. AB115971 * FK02114T Palacios et al., 2005
	12. EU370207 Du/CRO05 Santak et al., 2006	12. AB115988 * 1342 Palacios et al., 2006
		13. AB115997 * 1045 Palacios et al., 2006
		14. AB115998 * 1282 Palacios et al., 2006
		15. AB115999 * 1631 Palacios et al., 2006
		16. AB116000 * 888 Palacios et al., 2006
		17. AB116001 * 1550 Palacios et al., 2006
		18. AB116002 * 13 Palacios et al., 2006
		19. AB116003 * 1589 Palacios et al., 2006
		20. AB116009 * 36-1073 Palacios et al., 2006
		21. AB116014 * 011184L

		Palacios et al., 2006
		22. AB116017 * 02-34 Palacios et al., 2006
		23. AF280799 * Glouc1/UK96 Jin et al., 2000 Santak, et al., 2006
		24. AF526418 * 828505_SHG Utz et al., 2004
		25. AM293333 * MuV-ISR05-98642-G5 putativo NCBI
		26. AM293334 * MuVs-ISR05-98649-G5
		27. AM420294 * ES06-AAx25 NCBI
		28. AM420295 * ES06-ABx1 NCBI
		29. AM420296 * ES06-ACx1 NCBI
		30. AM420297 * ES06-ADx1 NCBI
		31. AM420298 * ES06-AEx1 NCBI
		32. AM420299 * ES06-AFx1 NCBI
		33. AM420300 * ES06-AGx1 NCBI
		34. AM766002 * Ast07/Sp
		35. AY380066 * UK99-162x3 Jin et al., 2004
		36. AY380067 * UK99-177x2 Jin et al., 2004
		37. AY380069 * UK99-208x22 Jin et al., 2004
		38. AY380070 * UK00-117x83 Jin et al., 2004
		39. AY380071 * UK00-13x11 Jin et al., 2004
		40. AY380072 * UK00-322x2 Jin et al., 2004
		41. AY380073 * UK00-46x7 Jin et al., 2004
		42. AY380074 * UK00-47x4 Jin et al., 2004
		43. AY380075 * UK01-22 Jin et al., 2004
		44. AY380076 * UK01-4x23 Jin et al., 2004

		45. AY380078 * UK02-304 Jin et al., 2004
		46. DQ139784 * Du/CRO05 Santak et al., 2006
		47. DQ661744 * MUM/NewJersey.US/2006 NCBI
		48. DQ664492 * Halifax 05-199-2125 NCBI
		49. DQ664493 * Halifax 05-269-1137 NCBI
		50. DQ664494 * Halifax 05-240-0605 NCBI
		51. DQ664495 * Halifax 05-259-2141 NCBI
		52. DQ664496 * Halifax 06-005-2502 NCBI
		53. DQ664497 * Halifax 06-038-1178 NCBI
		54. EU370207 * Du/CRO05 Santak et al., 2006
		55. EU597476 * MuVs-GBR99-51272-G2 Cui et al., 2009
		56. EU597477 * MuVs-GBR00-25827-G2 Cui et al., 2009
		57. EU597478 * MuVs-GBR0300796-G5 Cui et al., 2009
		58. EU606219 * MuVs-GBR00-14621-G2 Cui et al., 2009
		59. EU606220 * MuVs-GBR00-11411-G2 Cui et al., 2009
		60. EU606221 * MuVs-GBR00-17916-G2 Cui et al., 2009
		61. EU606222 * MuVs-GBR01-9947-G2 Cui et al., 2009
		62. EU606223 * MuVs-GBR01-12371-G2 Cui et al., 2009
		63. EU606224 * MuVs-GBR01-26221-G2 Cui et al., 2009
		64. EU606225 * MuVs-GBR01-25856-G2 Cui et al., 2009
		65. EU606226 * MuVs-GBR01-34910-G2 Cui et al., 2009
		66. EU606227 * MuVs-GBR01-38312-G2
		67. EU606228 * Mu Vs-GBR01-56227-G2 Cui et al., 2009

		68. EU606229 * MuVs-GBR02-35671-G2 Cui et al., 2009
		69. EU606230 * MuVs-GBR03-0360055-G2 Cui et al., 2009
		70. EU606231 * MuVs-GBR03-2340097-G2 Cui et al., 2009
		71. EU606232 * MuVs-GBR03-30320042-G2 Cui et al., 2009
		72. EU606233 * MuVs-GBR03-2800044-G2 Cui et al., 2009
		73. EU606234 * MuVs-GBR03-3820150-G2 Cui et al., 2009
		74. EU606235 * MuVs-GBR03-4000217-G2 Cui et al., 2009
		75. EU606236 * MuVs-GBR03-4140236-G2 Cui et al., 2009
		76. EU606237 * MuVs-GBR03-5240392-G2 Cui et al., 2009
		77. EU606238 * MuVs-GBR03-1000066-G2 Cui et al., 2009
		78. EU606239 * MuVs-GBR04-4740512-G2 Cui et al., 2009
		79. EU606240 * MuVs-GBR04-0600328-G2 Cui et al., 2009
		80. EU606241 * MuVs-GBR04-1480397-G2 Cui et al., 2009
		81. EU606242 * MuVs-GBR04-2980263-G2 Cui et al., 2009
		82. EU606243 * MuVs-GBR04-3080637-G2 Cui et al., 2009
		83. EU606244 * MuVs-GBR04-4100364-G2 Cui et al., 2009
		84. EU606245 * MuVs-GBR04-0540358-G2 Cui et al., 2009
		85. EU606246 * MuVs-GBR04-4740587-G2 Cui et al., 2009
		86. EU606247 * MuVs-GBR04-4740591-G2 Cui et al., 2009
		87. EU606248 * MuVs-GBR04-0640560-G2 Cui et al., 2009
		88. EU606249 * MuVs-GBR04-0240406-G2 Cui et al., 2009
		89. EU606250 * MuVs-GBR04-1180485-G2 Cui et al., 2009
		90. EU606251 * MuVs-GBR04-2000316-G2 Cui et al., 2009

		91. EU606252 * MuVs-GBR04-1500369-G2 Cui et al., 2009
		92. EU606253 * MuVs-GBR04-1560439-G2 Cui et al., 2009
		93. EU606254 * MuVs-GBR04-1620228-G2 Cui et al., 2009
		94. EU606255 * MuVs-GBR04-1620248-G2 Cui et al., 2009
		95. EU606256 * MuVs-GBR04-1780394-G2 Cui et al., 2009
		96. EU606257 * MuVs-GBR04-1800451-G2 Cui et al., 2009
		97. EU606258 * MuVs-GBR04-2000391-G2 Cui et al., 2009
		98. EU606259 * MuVs-GBR04-2600471-G2 Cui et al., 2009
		99. EU606260 * MuVs-GBRg05-1400511-G2 Cui et al., 2009
		100. EU606261 * MuVs-GBR05-1720540-G2 Cui et al., 2009
		101. EU606262 * MuVs-GBR05-0140766-G2 Cui et al., 2009
		102. EU606263 * MuVs-GBR00-34424-G5 Cui et al., 2009
		103. EU606264 * MuVs-GBR00-37835-G5 Cui et al., 2009
		104. EU606265 * MuVs-GBR00-48462-G5 Cui et al., 2009
		105. EU606266 * MuVs-GBR01-958-G5 Cui et al., 2009
		106. EU606267 * MuVs-GBR01-41158-G5 Cui et al., 2009
		107. EU606268 * MuVs-GBR01-56451-G5 Cui et al., 2009
		108. EU606269 * MuVs-GBR01-58281-G5 Cui et al., 2009
		109. EU606270 * MuVs-GBR02-34121-G5 Cui et al., 2009
		110. EU606271 * MuVs-GBR02-32889-G5 Cui et al., 2009
		111. EU606272 * MuVs-GBR02-9748-G5 Cui et al., 2009
		112. EU606273 * MuVs-GBR03-3520185-G5 Cui et al., 2009
		113. EU606274 * MuVs-GBR03-5220301-G5 Cui et al., 2009

		114. EU606275 * MuVs-GBR03-1440072-G5 Cui et al., 2009
		115. EU606276 * MuVs-GBR03-5220302-G5 Cui et al., 2009
		116. EU606277 * MuVs-GBR03-0640043-G5 Cui et al., 2009
		117. EU606278 * MuVs-GBR04-3420488-G5 no funcional Cui et al., 2009
		118. EU606279 * MuVs-GBR04-3560509-G5 Cui et al., 2009
		119. EU606280 * MuVs-GBR04-4440568-G5 Cui et al., 2009
		120. EU606281 * MuVs-GBR04-4400450-G5 Cui et al., 2009
		121. EU606282 * MuVs-GBR04-5180461-G5 Cui et al., 2009
		122. EU606283 * MuVs-GBR04-1880439-G5 Cui et al., 2009
		123. EU606284 * MuVs-GBR04-2560502-G5 no funcional Cui et al., 2009
		124. EU606285 * MuVs-GBR04-3140618-G5 Cui et al., 2009
		125. EU606286 * MuVs-GBR04-5360564-G5 no funcional Cui et al., 2009
		126. EU606287 * MuVs-GBR04-4260236-G5 Cui et al., 2009
		127. EU606288 * MuVs-GBR04-1620236-G5 Cui et al., 2009
		128. EU606289 * MuVs-GBR04-1540433-G5 Cui et al., 2009
		129. EU606290 * MuVs-GBR04-0360364-G5 no funcional Cui et al., 2009
		130. EU606291 * MuVs-GBR04-4360475-G5 Cui et al., 2009
		131. EU606292 * MuVs-GBR04-4580522-G5 Cui et al., 2009
		132. EU606293 * MuVs-GBR04-4580486-G5 Cui et al., 2009
		133. EU606294 * MuVs-GBR04-4560524-G5 no funcional Cui et al., 2009
		134. EU606295 * MuVs-GBR04-4560530-G5 Cui et al., 2009
		135. EU606296 * MuVs-GBR04-4960650-G5 Cui et al., 2009
		136. EU606297 * MuVs-GBR04-4980536-G5 Cui et al., 2009

		137. EU606298 * MuVs-GBR04-5040586-G5 Cui et al., 2009
		138. EU606299 * MuVs-GBR04-3080640-G5 Cui et al., 2009
		139. EU606300 * MuVs-GBR05-0220432-G5 no funcional Cui et al., 2009
		140. EU606301 * MuVs-GBR05-2560537-G5 Cui et al., 2009
		141. EU606302 * MuVs-GBR05-1060438-G5 Cui et al., 2009
		142. EU606303 * MuVs-GBR05-1400510-G5 Cui et al., 2009
		143. EU606304 * MuVs-GBR05 -5000558-G5 Cui et al., 2009
		144. EU606305 * MuVs-GBR05-0180586-G5 Cui et al., 2009
		145. EU606306 * MuVs-GBR05-0180591-G5 Cui et al., 2009
		146. EU606307 * MuVs-GBR05-0500400-G5 Cui et al., 2009
		147. EU606308 * MuVs-GBR05-0580480-G5 Cui et al., 2009
		148. EU606309 * MuVs-GBR05-0240747-G5 no funcional Cui et al., 2009
		149. EU606310 * MuVs-GBR05-0320495-G5 Cui et al., 2009
		150. EU606311 * MuVs-GBR05-1320345-G5 Cui et al., 2009
		151. EU606312 * MuVs-GBR05-1720294-G5 Cui et al., 2009
		152. EU606313 * MuVs-GBR05-1700315-G5 Cui et al., 2009
		153. EU606314 * MuVs-GBR05-2320463-G5 Cui et al., 2009
		154. EU606315 * MuVs-GBR05-2360475-G5 Cui et al., 2009
		155. EU606316 * MuVs-GBR05-2460425-G5 Cui et al., 2009
		156. EU606317 * MuVs-GBR05-2000687-G5 no funcional Cui et al., 2009
		157. EU606318 * MuVs-GBR05-3760001-G5 Cui et al., 2009
		158. EU606319 * MuVs-GBR05-4020005-G5 Cui et al., 2009
		159. EU606320 * MuVs-GBR05-4620050-G5

		Cui et al., 2009
		160. EU606321 * MuVs-GBR05-4620545-G5 Cui et al., 2009
		161. EU606322 * MuVs-GBR05-4860435-G5 Cui et al., 2009

*Se presentan el número de acceso de la secuencia, el nombre de la cepa y la referencia bibliográfica de donde se obtuvo el genotipo.

Tabla 8. Secuencias de los genes HN, F, SH del MuV obtenidas en el Gen Bank con genotipo H según el gen SH.

HN	F	SH
1.AF467767 88-1961 Amexis et al., 2003	1.AB085226 SA475/Ja97 Uchida et al., 2003	1. AB056148 * SA475/Ja97 Uchida et al., 2001
2. AF528332 Yeoju1498 Lee et al., 2003	2. AF467767 88-1961 Amexis et al., 2003	2. AB116015 * 001349L Palacios et al., 2006
3. AF528334 Yeoju1502 Lee et al., 2003	3. AY681495 PetroNov NCBI	3. AF315684 * S-12
4. AY681495 PetroNov NCBI	4. DQ525022 S-12 Alirezaie et al., 2008	4. AF365894 * DK/82/03 Teclé et al., 2001
5. EF208190 S-12 Alirezaie et al., 2008		5. AF365901 * DK/83/02 Teclé et al., 2001
		6. AF365920 *exceso de N DK/83/03 Teclé et al., 2001 *
		7. AF365923 * DK/88/01 Teclé et al., 2001
		8. AF467767 * 88-1961 Amexis et al., 2003
		9. AF526409 * 746573_SHG Utz et al., 2004
		10. AF526410 * 776274_SHG Utz et al., 2004
		11. AF526411 * 774189_SHG Utz et al., 2004
		12. AF526412 * 773106_SHG Utz et al., 2004
		13. AF526413 * 649171_SHG Utz et al., 2004
		14. AF526414 * 619401_SHG Utz et al., 2004
		15. AF526415 * 699589_SHG Utz et al., 2004
		16. AF526416 * 738409_SHG Utz et al., 2004
		17. AF526417 * 763699_SHG Utz et al., 2004

		18. AM293335 * MuVs-PAL04-85600-H
		19. AM293336 * MuVs-PAL04-85601-H NCBI
		20. AM293337 * MuVs-PAL04-86994-H NCBI
		21. AM293340 * MuVs-ISR04-94660-H putative NCBI
		22. AM766001 * Ast02/Sp
		23. AY048993 * Yeoju1498 Lee et al., 2003
		24. AY048994 * Yeoju1502 Lee et al., 2003
		25. AY299123 * sp1 Palacios et al., 2005
		26. AY299125 * sp3 Palacios et al., 2005
		27. AY299126 * sp4 Palacios et al., 2005
		28. AY299127 * sp6 Montes et al., 2002
		29. AY299128 * sp7 Palacios et al., 2005
		30. AY299129 * sp8 Montes et al., 2002
		31. AY299131 * sp11 Palacios et al., 2005
		32. AY299132 * sp10 Montes et al., 2002
		33. AY380064 * UK98-86x3 Jin et al., 2004
		34. AY681495 * PetroNov NCBI
		35. AY735417 * V090003 Palacios et al., 2005
		36. AY735418 * V0012 Palacios et al., 2005
		37. DQ136174 * H/Minsk.Belarus/44.01/ Atrasheuskaya, 2007
		38. DQ136175 * H/Minsk.Belarus/10.02/ Atrasheuskaya, 2007
		39. DQ250041 * H/Minsk.Belarus/09.03/ Atrasheuskaya, 2007
		40. EF208190 * S-12 Alirezaie et al., 2008
		41. EU798272 * MuVs-TUR06-1-H
		42. EU798273 * MuVs-TUR06-35-H

		43. EU798274 * MuVs-TUR06-38-H
		44. EU798275 * MuVs-TUR06-68-H
		45. EU798276 * MuVs-TUR06-76-H
		46. EU798277 * MuVs-TUR07-77-H
		47. EU798278 * MuVs-TUR07-78-H
		48. U35849 * YLB95 Strohle et al., 1996

*Se presentan el número de acceso de la secuencia, el nombre de la cepa y la referencia bibliográfica de donde se obtuvo el genotipo.

Tabla 9. Secuencias de los genes HN, F, SH del MuV obtenidas en el Gen Bank con genotipo I según el gen SH.

HN	F	SH
1. AB003424 MP-93-AK Kashiwagi et al., 1999	1. AB003424 MP-93-AK Kashiwagi et al., 1999	1. AB003424 * MP-93-AK Kashiwagi et al., 1999
2. AF528327 Dae981062 Lee et al., 2003	2. AY309060 Dg1062/Korea/98 Lee, et al., 2003	2. AF180374 * AA 97-12 Kim et al., 2000
3. AF528328 UI981098 Lee et al., 2003		3. AF180375 * AS 97-1 Kim et al., 2000
4. AF528329 Dae981134 Lee et al., 2003		4. AF180376 * AS 97-8 Kim et al., 2000
5. AF528330 KN991092 Lee et al., 2003		5. AF180377 * CS 98-2 Kim et al., 2000
6. AF528331 KG991229 Lee et al., 2003		6. AF180378 * DD 98-40 Kim et al., 2000
7. AF528333 Ps991275 Lee et al., 2003		7. AF180379 * IS 98-4 Kim et al., 2000
8. AF528335 CB2k1480 Lee et al., 2003		8. AF180380 * IS 98-48 Kim et al., 2000
9. AY309060 Dg1062/Korea/98 Lee, et al., 2003		9. AF180381 * IS 98-50 Kim et al., 2000
10. D86170 Odate-1 Saito et al., 1996		10. AF180382 * IS 98-53 Kim et al., 2000
		11. AF180383 * IS 98-56 Kim et al., 2000
		12. AF180384 * IS 98-58 Kim et al., 2000
		13. AF180385 * IS 98-60 Kim et al., 2000
		14. AF180386 * IS 98-61 Kim et al., 2000
		15. AF180387 * KJ 98-25

		Kim et al., 2000
		16. AF180388 * KJ 98-29 Kim et al., 2000
		17. AF528338 * Dae981062 Lee et al., 2003
		18. AF528339 * UI981098 Lee et al., 2003
		19. AF528340 * Dae981134 Lee et al., 2003
		20. AF528342 * KN991092 Lee et al., 2003
		21. AF528343 * KG991229 Lee et al., 2003
		22. AF528347 * Ps991275 Lee et al., 2003
		23. AF528350 * CB2k1480 Lee et al., 2003
		24. AY309060 * Dg1062/Korea/98 Lee, et al., 2003
		25.D86174 Odate-1 Orvell et al., 1997

*Se presentan el número de acceso de la secuencia, el nombre de la cepa y la referencia bibliográfica de donde se obtuvo el genotipo.

Tabla 10. Secuencias de los genes HN, F, SH del MuV obtenidas en el Gen Bank con genotipo J según el gen SH.

HN	F	SH
		1. AB056144 * SA967/Ja99 Uchida et al., 2001
		2. AB056147 * TK087/Ja97 Uchida et al., 2001
		3. AF365897 * DK/82/06 Teclé et al., 2001
		4. AF365917 * DK/83/05 Teclé et al., 2001
		5. AF365918 * DK/83/06 * Teclé et al., 2001
		6. AF365919 * DK/83/07 Teclé et al., 2001
		7. AF365921 * DK/83/04 Teclé et al., 2001
		8. AF365922 * DK/85/01 Teclé et al., 2001
		9. AF365924 * DK/88/02 Teclé et al., 2001

		10. AM293339 * MuVs-ISR04-94507-J NCBI
		11. EU497649 * MuVi/Bangkok.THA/37.07-1 NCBI
		12. EU497650 * MuVi/Bangkok.THA/37.07-2 NCBI
		13. EU497651 * MuVs/Phang-nga.THA/4.08-2 NCBI
		14. EU497652 * MuVs/Phang-nga.THA/4.08-3 NCBI
		15. EU497653 * MuVs/Phang-nga.THA/4.08-4 NCBI
		16. EU497654 * MuVs/Phang-nga.THA/4.08-5 NCBI
		17. EU497655 * MuVs/Phang-nga.THA/4.08-7 NCBI
		18. EU497656 * MuVs/Phang-nga.THA/4.08-10 NCBI
		19. EU497657 * MuVs/Phang-nga.THA/4.08-14 NCBI
		20. EU597479 * MuVs-GBR03-5020241-J Cui et al., 2009
		21. EU606323 * MuVs-GBR03-4800382-J Cui et al., 2009
		22. EU606324 * MuVs-GBR03-5240393-J Cui et al., 2009
		23. EU606325 * MuVs-GBR04-4060413-J Cui et al., 2009
		24. EU606326 * MuVs-GBR04-5380522-J Cui et al., 2009
		25. EU606327 * MuVs-GBR04-3580313-J Cui et al., 2009
		26. EU606328 * MuVs-GBR04-3840367-J Cui et al., 2009
		27. EU606329 * MuVs-GBR04-2740419-J Cui et al., 2009
		28. EU606330 * MuVs-GBR04-2220179-J Cui et al., 2009
		29. EU606331 * MuVs-GBR04-2221349-J Cui et al., 2009
		30. EU606332 * MuVs-GBR04-2480510-J Cui et al., 2009
		31. EU606333 * MuVs-GBR04-2640655-J Cui et al., 2009
		32. EU606334 * MuVs-GBR04-4340583-J Cui et al., 2009

		33. EU606335 * MuVs-GBR04-4580520-J Cui et al., 2009
		34. EU606336 * MuVs-GBR04-4600464-J Cui et al., 2009
		35. EU606337 * MuVs-GBR04-4900281-J Cui et al., 2009
		36. EU606338 * MuVs-GBR04-4800518-J Cui et al., 2009
		37. EU606339 * MuVs-GBR04-4920925-J Cui et al., 2009
		38. EU606340 * MuVs-GBR04-4900455-J Cui et al., 2009
		39. EU606341 * MuVs-GBR04-5380494-J Cui et al., 2009
		40. EU606342 * MuVs-GBR04-3400295-J Cui et al., 2009
		41. EU606343 * MuVs-GBR05-4800518-J Cui et al., 2009
		42. EU606344 * MuVs-GBR05-1940420-J Cui et al., 2009
		43. EU606345 * MuVs-GBR05-1980357-J Cui et al., 2009
		44. EU606346 * MuVs-GBR05-3620002-J Cui et al., 2009
		45. EU606347 * MuVs-GBR05-0420582-J Cui et al., 2009
		46. EU606348 * MuVs-GBR05-0200474-J Cui et al., 2009
		47. EU606349 * MuVs-GBR05-1100479-J Cui et al., 2009
		48. EU606350 * MuVs-GBR05-2040508-J Cui et al., 2009
		49. EU606351 * MuVs-GBR05-17600456-J Cui et al., 2009
		50. EU606352 * MuVs-GBR05-3620620-J Cui et al., 2009
		51. EU606353 * MuVs-GBR05-0120048-J Cui et al., 2009

*Se presentan el número de acceso de la secuencia, el nombre de la cepa y la referencia bibliográfica de donde se obtuvo el genotipo.

Tabla 11. Secuencias de los genes HN, F, SH del MuV obtenidas en el Gen Bank con genotipo K según el gen SH.

HN	F	SH
1.AB003415 MP-93-N Kashiwagi et al., 1999	1.AB003415 MP-93-N Kashiwagi et al., 1999	1.AB003415 * MP-93-N Kashiwagi et al., 1999
	2. AB085227 SA967/Ja99 Uchida et al., 2003	2. AB105474 * Himeji 364/JPN.00 Inou et al., 2004
		3. AB105475 * Sapporo K-4/JPN.00 Inou et al., 2004
		4. AF365891 * DK/81/01 Teclé et al., 2001
		5. AY380079 * UK02-361 Jin et al., 2004

*Se presentan el número de acceso de la secuencia, el nombre de la cepa y la referencia bibliográfica de donde se obtuvo el genotipo.

Tabla 12. Secuencias de los genes HN, F, SH del MuV obtenidas en el Gen Bank con genotipo L según el gen SH.

HN	F	SH
		1. AB105479 * Tokyo M-50/JPN.00 Inou et al., 2004
		2. AB105480 * Tokyo S-III-10/JPN.01 Inou et al., 2004
		3. AB105483 * Fukuoka 49/JPN.00 Inou et al., 2004

*Se presentan el número de acceso de la secuencia, el nombre de la cepa y la referencia bibliográfica de donde se obtuvo el genotipo.

Tabla 13. Secuencias de los genes HN, F, SH del MuV obtenidas en el Gen Bank con genotipo M según el gen SH.

HN	F	SH
		1.EU069917 * MuVi-BRA06-4070-M Santos et al., 2008
		2. EU069918 * MuVi-BRA07-33-M Santos et al., 2008
		3. EU069919 * MuVi-BRA07-327-M Santos et al., 2008
		4. EU069920 * MuVi-BRA07-664-M Santos et al., 2008
		5. EU069921 * MuVi-BRA07-1125-M Santos et al., 2008
		6. EU069922 * MuVi-BRA07-1127-M Santos et al., 2008

		7. EU069923 * MuVi-BRA07-1131-M Santos et al., 2008
		8. EU069924 * MuVi-BRA07-1133-M Santos et al., 2008
		9. EU069925 * MuVi-BRA07-1135-M Santos et al., 2008
		10. EU069926 * MuVi-BRA07-1139-M Santos et al., 2008
		11. EU069927 * MuVi-BRA07-1225-M Santos et al., 2008
		12. EU069928 * MuVi-BRA07-1227-M Santos et al., 2008
		13. EU069929 * MuVi-BRA07-1228-M Santos et al., 2008
		14. EU069930 * MuVi-BRA07-1402-M Santos et al., 2008
		15. EU082456 * MuVI-BRA07-2188-M Santos et al., 2008
		16. EU082457 * MuVi-BRA07-2280-M Santos et al., 2008
		17. EU082458 * MuVi-BRA07-2484-M Santos et al., 2008
		18. EU082459 * MuVi-BRA07-3113-M Santos et al., 2008

*Se presentan el número de acceso de la secuencia, el nombre de la cepa y la referencia bibliográfica de donde se obtuvo el genotipo.

Tabla 14. Secuencias de los genes HN, F, SH del MuV obtenidas en el Gen Bank pertenecientes a la cepa Leningrado-Zagreb (sin genotipo establecido)

HN	F	SH
1. AY583323 L-Zagreb vacuna	1. AM181760 L-Zagreb vacuna	1. AJ272363 * L-Zagreb
2. AY685920 L-Zagreb vacuna Ivancic et al., 2004	2. AY685920 L-Zagreb vacuna Ivancic et al., 2004	2. AM076488 * L-Zagreb
3. AY685921 L-Zagreb semilla maestra Ivancic et al., 2004	3. AY685921 L-Zagreb semilla maestra Ivancic et al., 2004	3. AY493374 * Leningrad-3
		4. AY685920 * L-Zagreb vacuna Ivancic et al., 2004
		5. AY685921 * L-Zagreb semilla maestra Ivancic et al., 2004

*Se presentan el número de acceso de la secuencia, el nombre de la cepa y la referencia bibliográfica de donde se obtuvo el genotipo.

Tabla 15. Secuencias de los genes HN, F, SH del MuV obtenidas en el Gen Bank sin clasificar.

HN	F	SH
1. AB003417 MP-94-H	1. AF143385 V6	1. AB003417 MP-94-H
2. AJ238210 Po15/t	2. AY376471 ZgB/Cro69	2. AB056150 SA32/Ja95 *
3. AJ276172 PZH-17 pase2, aislado en liq amniótico	3. FJ375178 Gw7	3. AB115972 * 519
4. AJ276173 PZH-17 pase8 en Wi-38	4. M171412	4. AB115973 * 680
5. AJ276174 PZH-17 pase 14 en Wi-38		5. AB115974 * 128R
6. AJ276175 PZH-17 pase 70 en Wi-38		6. AB115975 * 764
7. AJ276176 PZH-17 pase19 en Wi-38		7. AB115976 * 825
8. AY376471 ZgB/Cro69		8. AB115977 * 822
9. FJ375178 Gw7		9. AB115978 * 681
10. X93177 Edinburgh-4/3		10. AB115979 * 793
		11. AB115980 * 471
		12. AB115981 * 933
		13. AB115982 * 785
		14. AB115983 * 750
		15. AB115984 * 449
		16. AB115985 * 1279
		17. AB115986 * 478
		18. AB115987 * 1270
		19. AB115989 * 938
		20. AB115990 * 1472
		21. AB115991 * 941
		22. AB115992 * 1052
		23. AB115993 * 905
		24. AB115994 * 72
		25. AB115995 * 1333
		26. AB115996 * 1700
		27. AB116004 * 804
		28. AB116005 * 1315
		29. AB116006 * 851
		30. AB116007 * 4-1172
		31. AB116008 * 62-20
		32. AB116010 * 62-23
		33. AB116011 *

		36-1079
		34. AB116012 * 62-25
		35. AB116013 * 20-747
		36. AB116016 * 02-49
		37. AB116018 * 1250
		38. AB205224 * SA276/Ja97
		39. AB205225 * SA312/Ja97
		40. AJ272362 * PZH-17
		41. AM293341 * MuVs-PAL05-101166 (putativa)
		42. AY039724 * Lit927
		43. AY299124 * sp2
		44. AY376471 * ZgB/Cro69
		45. AY380077 * UK02-19
		46. AY735412 * 506NE96
		47. AY735413 * 772NE96
		48. AY735414 393NE96
		49. AY735415 * 265NE96
		50. AY735416 * 353NE96
		51. AY735419 * 448-99
		52. DQ268536 * KM
		53. DQ269149 * China
		54. FJ375178 * Gw7
		55. FJ545657 * BJ-1
		56. M25421 * Sin nombre

*Se presentan el número de acceso de la secuencia, el nombre de la cepa y la referencia bibliográfica de donde se obtuvo el genotipo.

II. ANÁLISIS DE MUTACIONES NO SINÓNIMAS (CON SENTIDO) IDENTIFICADAS EN LAS SECUENCIAS DE LA PROTEÍNA HN AGRUPADAS POR GENOTIPOS (DE ACUERDO AL GEN SH)

Tabla.16. Mutaciones no sinónimas (con sentido) identificadas en las secuencias de las proteínas HN del MuV con genotipo A.

No. acceso, genotipo y nombre de la cepa	No. de nt	Cambio de codón Tipo de mutación	Localización (aa)	Cambio de aa	Naturaleza de la mutación y criterio de selección
M55065-A- SBL-1	43	TTT/GTT Transversión	15	F/V	Hidrofóbico/Hidrofóbico Fenilalanina
AF201473-A-JL5 AF338106-A-JL5-vacuna AY584603-A-JL5-vacuna FJ211586-A-JL5 FJ211585-RIT4385	131	ACC/ATC Transición	44	T/I	Polar sin carga/Hidrofóbico Hidrofobicidad
AY502062-A-KILHAM EF493026-A-Kilham	206	TCT/TTT Transición	69	S/F	Polar sin carga/Hidrofóbico Hidrofobicidad, fenilalanina
X93178-A-JL2 AF345290-A-JL2-vacuna AY584604-A-JL2-vacuna	241	GTG/ATG Transición	81	V/M	Hidrofóbico/Hidrofóbico
U37758-A-Rubini X93176-A-Enders X93180-A-Rubini	316	GGA/AGA Transición	106	G/R	Polar sin carga/básico Glicina
X93179-A-JL5 AF201473-A-JL5 AF338106-A-JL5-vacuna AY584603-A-JL5-vacuna FJ211585-RIT4385 FJ211586-A-JL5	403	GTT/ATT Transición	135	V/I	Hidrofóbico/Hidrofóbico -
M55065-A-SBL-1	481	CAT/AAT Transversión	161	H/N	Básico/polar sin carga -
AY502062-A-KILHAM	526	AAT/CAT Transversión	176	N/H	Polar sin carga/básico -
X93178-A-JL2	614	CAT/CGT Transición	205	H/R	Básico/básico donador o aceptor/donador
X93178-A-JL2	641	ATG/ACG Transición	214	M/T	Hidrofóbico/polar sin carga Hidrofobicidad
X93179-A-JL5 AF201473-A-JL5 AF338106-A-JL5-vacuna AY584603-A-JL5-vacuna FJ211585-RIT4385 FJ211586-A-JL1	653	GTT/GCT Transición	218	V/A	Hidrofóbico/Hidrofóbico -
M55065-A-SBL-1	793	ACC/GCC Transición	265	T/A	Polar sin carga/Hidrofóbico Hidrofobicidad
M55065-A-SBL-1	796	GAC/AAC Transición	266	D/N	Ácido/polar sin carga - Donador/donador o aceptor
U37758-A-Rubini X93176-A-Enders X93180-A-Rubini	798	GAC/GCC Transversión	266	D/A	Hidrofóbico/ácido Hidrofobicidad
X93179-A-JL5 AF201473-A-JL5 AF338106-A-JL5-vacuna	836	ACC/ATC Transición	279	T/I	Polar sin carga/Hidrofóbico Hidrofobicidad

AY584603-A-JL5-vacuna FJ211585-RIT4385 FJ211586-A-JL5					
AY502062-A-KILHAM EF493026-A-Kilham X93178-A-JL2 AF345290-A-JL2-vacuna AY584604-A-JL2-vacuna	863	ACA/AAA Transversión	288	T/K	Polar sin carga/básico
EF493026-A-Kilham	899	CTT/TTT Transición	297	L/F	Polar/Hidrofóbico Hidrofobicidad, aromático
X93179-A-JL5 AF201473-A-JL5 AF338106-A-JL5-vacuna AY584603-A-JL5-vacuna FJ211585-RIT4385 FJ211586-A-JL5	1007	TCA/TTA Transición	336	S/L	Polar sin carga/Hidrofóbico Hidrofobicidad
AY502062-A-KILHAM	1061, 1062	CCA/CAC	<u>354</u>	P/H	Hidrofóbico/básico Hidrofobicidad, prolina
X93179-A-JL5 AF201473-A-JL5 AF338106-A-JL5-vacuna AY584603-A-JL5-vacuna FJ211585-RIT4385 FJ211586-A-JL5	1062	CCA/CAA Transversión	354	P/Q	Hidrofóbico/polar sin carga Hidrofobicidad, prolina
EF493026-A-Kilham	1060	CCA/TCA Transición	354	P/S	Hidrofóbico/polar sin carga Hidrofobicidad, prolina
AY502062-A-KILHAM	1066, 1067, 1068	GAG/AGC Transición Transición Transversión	356	E/S	Ácido/polar sin carga
M55065-A-SBL-1	1104	AGT/AGA Transversión	368	S/R	Polar sin carga/básico
AY502062-A-KILHAM	1115	AGT/AAT Transición	372	S/N	Polar sin carga/polar sin carga -
AY502062-A-KILHAM	1153	AAT/GAT Transición	385	N/D	Polar sin carga/ácido
AY502062-A-KILHAM	1165	GTT/ATT Transversión	389	V/I	Hidrofóbico/Hidrofóbico -
X93179-A-JL5 AF201473-A-JL5 AF338106-A-JL5-vacuna AY584603-A-JL5-vacuna FJ211585-RIT4385 FJ211586-A-JL1	1325, 1326	TCT/TAC	442	S/Y	Polar sin carga/polar sin carga
AY502062-A-KILHAM	1340	GTG/GGG Transversión	447	V/G	Hidrofóbico/polar sin carga Hidrofobicidad, glicina
M55065-A-SBL-1	1376	CGT/CCT Transversión	459	R/P	Básico/Hidrofóbico Hidrofobicidad , glicina
X93178-A-JL2 AF345290-A-JL2-vacuna AY584604-A-JL2-vacuna	1385	TCG/TTG Transición	462	S/L	Polar sin carga/Hidrofóbico Hidrofobicidad
X93179-A-JL5 AF201473-A-JL5 AF338106-A-JL5-vacuna AY584603-A-JL5-vacuna FJ211585-RIT4385 FJ211586-A-JL5	1390	CAC/ AAC Transversión	464	H/N	Básico/polar sin carga

AF345290-A-JL2-vacuna AY584604-A-JL2-vacuna	1390, 1392	CAC/AAA	<u>464</u>	H/Y	Básico/polar sin carga
M55065-A-SBL-1 U37758-A-Rubini X93176-A-Enders X93180-A-Rubini	1402	GAA/AAA Transición	468	E/K	Ácido/básico Formación de EPH
X93178-A-JL2 AF345290-A-JL2-vacuna AY584604-A-JL2-vacuna	1408	GTA/ATA Transición	470	V/I	Hidrofóbico/Hidrofóbico
AY502062-A-KILHAM X93179-A-JL5 AF201473-A-JL5 AF338106-A-JL5-vacuna AY584603-A-JL5-vacuna FJ211585-RIT4385 FJ211586-A-JL5	1418	ACA/ATA Transición	473	T/I	Polar sin carga/hidrofóbico Hidrofobicidad
X93176-A-Enders	1429	TCA/ACA Transversión	477	S/T	Polar sin carga/polar sin carga -
X93179-A-JL5 AF201473-A-JL5 AF338106-A-JL5-vacuna AY584603-A-JL5-vacuna FJ211585-RIT4385 FJ211586-A-JL1	1470	AGC/AGA Transversión	490	S/R	Polar sin carga/básico
X93180-A-Rubini	1490	AGA/ATA Transversión	497	R/I	Básico/Hidrofóbico Hidrofobicidad
AY502062-A-KILHAM	1567	AAT/GAT Transición	523	N/D	Polar sin carga/ácido
X93178-A-JL2	1655	GCT/GTT Transición	552	A/V	Hidrofóbico/Hidrofóbico -

Tabla 17. Mutaciones no sinónimas (con sentido) identificadas en las secuencias de las proteínas HN del MuV con genotipo B.

No. acceso, genotipo y nombre de la cepa	No. de nt	Cambio de codón Tipo de mutación	No. de aa	Cambio de aa	Naturaleza de la mutación y criterio de selección
AB003413-B-MP-77-M AB003418-B-MP-89-OI AB003425-B-MP77-SA AB003426-B-MP-77-SU	5	GAG/GGG Transición	2	G/E	Polar sin carga/ácido glicina
AF448531-B-5011	16	CTC/TTC Transición	6	L/F	Hidrofóbico/Hidrofóbico - Aromático
AF448531-B-5011 AF448528-B-4972 AF448532-B-5012 AF448533-B-5192 AF448529-B-4990 AF448534-B-4971 AF448527-B-4829 AF448530-B-4991	27	ATG/ATA Transición	9	M/I	Hidrofóbico/Hidrofóbico -
AF448531-B-5011	35	AAT/AGT Transición	12	N/S	Polar sin carga/polar sin carga -

AF448528-B-4972 AF448532-B-5012 AF448533-B-5192 AF448529-B-4990 AF448534-B-4971 AF448527-B-4829 AF448530-B-4991	34	AAT/GAT Transición	12	N/D	Polar sin carga/ácido
AB003421-B-MP-77-T AB003420-B-MP-80-M AB003423-B-MP-80-J	46	GCA/ACA Transición	16	A/T	Hidrofóbico/polar sin carga Hidrofobicidad Hidrofobicidad
F314562-B-871005 FJ375177-B-1004-10/2 AF314559-B-SmithKline- Beecham X93181-B-Urabe-vacuna AF314558-B-SIPAR-02 X99040-B-UrabeAM9- comercial AF314560-B-871004 AF314561-B-Biken X99041-B-UrabeAm9- BB871004	58	GTT/TTT Transversión	20	V/F	Hidrofóbico/Hidrofóbico Aromático-
AB470486-B-Hoshino	61	ATC/GTC Transición	21	I/V	Hidrofóbico/Hidrofóbico
AB003422-B-MP-89-K	86	TTC/TCT Transición Transición	29	F/S	Hidrofóbico/polar sin carga Hidrofobicidad
AB003422-B-MP-89-K	110	GTA/GCA Transición	37	V/A	Hidrofóbico/Hidrofóbico -
AB003418-B-MP-89-OI AB003419-B-MP89-OS	115	TCT/ACT Transversión	39	S/T	Polar sin carga/polar sin carga -
AB003418-B-MP-89-OI AB003419-B-MP89-OS	124	GCT/TCT Transversión	42	A/S	Hidrofóbico/polar sin carga Hidrofobicidad
AB003416-B-MP-85-S	163	CTT/TTT Transición	55	L/F	Hidrofóbico/Hidrofóbico Aromático
AB003413-B-MP-77-M	171	AGG/AGT Tranversión	57	R/S	Básico/polar sin carga
AB003418-B-MP-89-OI AB003419-B-MP89-OS	172	ATG/CTG Transversión	58	M/L	Hidrofóbico/Hidrofóbico
AF448528-B-4972 AF448532-B-5012 AF448533-B-5192 AF448534-B-4971 AF448527-B-4829 AF448530-B-4991	206, 207	TCT/TTC Transición Transición	69	S/F	Polar sin carga/Hidrofóbico Hidrofobicidad, aromático
AF448529-B-4990	206	TCT/TTT Transición	69	S/F	Polar sin carga/Hidrofóbico Hidrofobicidad, fenilalanina
AF448528-B-4972 AF448532-B-5012 AF448533-B-5192 AF448529-B-4990 AF448534-B-4971 AF448527-B-4829 F448530-B-4991	212	ATT/ACT Transición	71	I/T	Hidrofóbico/polar sin carga Hidrofobicidad
AF448531-B-5011 AF448528-B-4972 AF448532-B-5012 AF448533-B-5192	214	GCA/ACA Transición	72	A/T	Hidrofóbico/polar sin carga Hidrofobicidad

AF448529-B-4990 AF448534-B-4971 AF448527-B-4829 AF448530-B-4991					
AF448527-B-4829	244	ATT/CTT Transversión	82	I/L	Hidrofóbico/Hidrofóbico -
AF448531-B-5011	337	TCC/GCC Transversión	113	S/A	Polar sin carga/Hidrofóbico Hidrofobicidad
AB470486-B-Hoshino	355	TGT/CGT Transición	119	R/C	Básico/polar sin carga
AF448531-B-5011 AF448528-B-4972 AF448532-B-5012 AF448533-B-5192 AF448529-B-4990 AF448534-B-4971 AF448527-B-4829 AF448530-B-4991	362	GGC/AGC Transición	121	G/S	Polar sin carga/polar sin carga Glicina
AF448531-B-5011	364	AAA/CAA Transversión	122	K/Q	Básico/polar sin carga
AF448527-B-4829	371	CAA/CGA Transición	124	Q/R	Polar sin carga/básico
AF448528-B-4972 AF448532-B-5012 AF448533-B-5192 AF448529-B-4990 AF448534-B-4971 AF448527-B-4829 AF448530-B-4991	376	TCA/GCA Transversión	126	S/A	Polar sin carga/Hidrofóbico Hidrofobicidad
AF448528-B-4972 AF448532-B-5012 AF448533-B-5192 AF448529-B-4990 AF448534-B-4971 AF448527-B-4829 AF448530-B-4991	392	AAC/AGC Transición	131	N/S	Polar sin carga/polar sin carga -
AB003416-B-MP-85-S	482	CAT/CTT Transversión	161	H/L	Básico/Hidrofóbico Hidrofobicidad
AF448532-B-5012 AF448533-B-5192 AF448529-B-4990 AF448534-B-4971 AF448527-B-4829 AF448530-B-4991	609	AAG/AAT Transversión	203	K/N	1Básico/polar sin carga
AB003413-B-MP-77-M	608	AAG/AGG Transición	203	K/R	Básico/básico -
AF448531-B-5011 AF448528-B-4972	624, 626	ATT/GTA Transición Transversión	212	I/V	Hidrofóbico/Hidrofóbico
AF448532-B-5012 AF448533-B-5192 AF448529-B-4990 AF448534-B-4971 AF448527-B-4829 AF448530-B-4991	624	ATT/GTT Transición	212	I/V	Hidrofóbico/Hidrofóbico
AF448530-B-4991	646	ATT/GTT Transición	216	I/V	Hidrofóbico/Hidrofóbico

AB003413-B-MP-77-M AB003421-B-MP-77-T AB003420-B-MP-80-M AB003423-B-MP-80-J AB003422-B-MP-89-K AB003416-B-MP-85-S AB003418-B-MP-89-OI AB003419-B-MP89-OS AB003425-B-MP77-SA AB003412-B-MP76-S AB003426-B-MP-77-SU	719	ATC/TTC Transversión	240	N/I	Polar sin carga/Hidrofóbico Hidrofobicidad
AB003421-B-MP-77-T AB003420-B-MP-80-M AB003423-B-MP-80-J	883	ACT/GCT Transición	295	T/A	Polar sin carga/Hidrofóbico Hidrofobicidad
AF448531-B-5011 AF448528-B-4972 AF448532-B-5012 AF448533-B-5192 AF448529-B-4990 AF448534-B-4971 AF448527-B-4829 AF448530-B-4991	883	ACT/TCT Transición	295	T/S	Polar ácido/polar sin carga -
AB003426-B-MP-77-SU	934	ATA/GTA Transición	312	I/V	Hidrofóbico/Hidrofóbico
AF448532-B-5012 AF448533-B-5192	977	GTC/GCC Transición	326	V/A	Hidrofóbico/Hidrofóbico -
NC_002200-B-Miyahara X15284-B-Miyahara- vacuna	991	ACA/TCA Transversión	331	T/S	Polar sin carga/polar sin carga -
AB003412-B-MP76-S	995	CTC/CCC Transición	332	L/P	Hidrofóbico/Hidrofóbico Prolina
X93181-B-Urabe-vacuna	1003	AAA/GAA Transición	335	E/K	Ácido/básico Formación de EPH
AB003420-B-MP-80-M	1058	CCA/CTA Transición	353	P/L	Hidrofóbico/Hidrofóbico Prolina
AF448531-B-5011 AF448528-B-4972	1057	CCA/TCA Transición	353	P/S	Hidrofóbico/polar sin carga Prolina
AB003413-B-MP-77-M AB003421-B-MP-77-T AB003420-B-MP-80-M AB003423-B-MP-80-J	1088	AGA/AAA Transición	363	R/K	Básico/básico -
AF448531-B-5011 AF448528-B-4972	1123	GTA/ATA Transición	375	V/I	Hidrofóbico/Hidrofóbico
AF448528-B-4972 AF448532-B-5012 AF448533-B-5192	1192	TCA/TTA Transición	398	L/S	Hidrofóbico/polar sin carga Hidrofobicidad
AF448528-B-4972 AF448532-B-5012 AF448533-B-5192	1196	AAC/AGC Transición	399	N/S	Polar sin carga/polar sin carga -
AF448531-B-5011 AF448528-B-4972 AF448529-B-4990 AF448534-B-4971 AF448527-B-4829 AF448530-B-4991	1205	ACA/ATA Transición	402	T/I	Polar sin carga/Hidrofóbico Hidrofobicidad
AF448532-B-5012 AF448533-B-5192	1207	CTG/ATG Transversión	403	L/M	Hidrofóbico/Hidrofóbico

AB003422-B-MP-89-K	1290	GAA/GAC Transversión	430	E/D	Ácido/ácido -
AB003421-B-MP-77-T AB003420-B-MP-80-M AB003423-B-MP-80-J	1303	ATA/TTA Transversión	435	I/L	Hidrofóbico/Hidrofóbico -
AB003418-B-MP-89-OI AB003419-B-MP89-OS	1313	ACA/ATA Transición	438	T/I	Polar sin carga/Hidrofóbico Hidrofobicidad
AF448532-B-5012 AF448533-B-5192	1331	CAA/CCA Transversión	444	Q/P	Polar sin carga/Hidrofóbico Prolina
AB003422-B-MP-89-K	1366	TCA/CCA Transición	456	S/P	Polar sin carga/Hidrofóbico Prolina
AF314562-B-871005 FJ375177-B-1004-10/2 AF314559-B-Smith-Kline- Beecham	1392	AAC/AAA Transversión	464	N/K	Polar sin carga/básico
AF448528-B-4972	1417	ACT/GCT Transición	473	T/A	Polar sin carga/Hidrofóbico Hidrofobicidad
AB003413-B-MP-77-M	1441	CTT/ATT Transversión	481	L/I	Hidrofóbico/Hidrofóbico -
AB003421-B-MP-77-T AB003420-B-MP-80-M AB003423-B-MP-80-J	1471	CAC/TAC Transición	491	H/Y	Básico/polar sin carga -
AB003420-B-MP-80-M AB003423-B-MP-80-J	1532	ACT/AAT Transversión	511	T/N	Polar sin carga/polar sin carga
AF448531-B-5011 AF448528-B-4972 AF448534-B-4971 AF448527-B-4829 AF448530-B-4991	1531, 1533	ACT/GCC Transición Transición	511	T/A	Polar sin carga/Hidrofóbico Hidrofobicidad
AF448529-B-4990	1531	ACT/GCT Transición	511	T/A	Polar sin carga/Hidrofóbico Hidrofobicidad
FJ375177-B-1004-10/2	1578	AAA/AAC Transversión	526	K/N	Básico/polar sin carga
AF448531-B-5011 AF448528-B-4972 AF448532-B-5012 AF448533-B-5192 AF448529-B-4990 AF448534-B-4971 AF448527-B-4829 AF448530-B-4991	1598	AAT/ACT Transversión	533	N/T	Polar sin carga/polar sin carga
X93181-B-Urabe-vacuna	1649	GGT/GAT Transición	550	G/D	Polar sin carga/Hidrofóbico Hidrofobicidad, glicina
AB003413-B-MP-77-M	1654	GCT/ACT Transición	552	A/T	Hidrofóbico/polar sin carga Hidrofobicidad

Tabla.18.Mutaciones no sinónimas (con sentido) identificadas en las secuencias de las proteínas HN del MuV con genotipo C.

No. acceso, genotipo y nombre de la cepa	No.de nt	Cambio de codón. Tipo de mutación	No. de aa	Cambio de aa	Naturaleza de la mutación y criterio de selección
EU370206-C-9218/Zg98	34	GAT/AAT	12	D/N	Ácido/polar sin carga -

DQ139782-C-9218/Zg98		Transición			
EU370206-C-9218/Zg98 DQ139782-C-9218/Zg98	37	GCC/ACC Transición	13	T/A	Polar sin carga/Hidrofóbico Hidrofobicidad
AY502058-C-Lit-1013	58	GTT/ATT Transición	20	V/I	Hidrofóbico/Hidrofóbico
EU370206-C-9218/Zg98 DQ139782-C-9218/Zg98	68	GTG/GCG Transición	23	A/V	Hidrofóbico/Hidrofóbico -
AY502058-C-Lit-1013	74, 75	GAC/GTC Transversión	25	D/V	Ácido/Hidrofóbico Hidrofobicidad
AY502058-C-Lit-1013	76, 78	AAG/CAC Transversión Transversión	26	K/H	Básico/básico
AY502058-C-Lit-1013	80, 81	AAG/ACA Transversión Transición	27	K/T	Básico/polar sin carga
AY502058-C-Lit-1013	143	GTT/GCT Transición	48	V/A	Hidrofóbico/Hidrofóbico -
EU370206-C-9218/Zg98 DQ139782-C-9218/Zg98 U37760-C-YLB92 AY502058-C-Lit-1013	152	ATT /ACT Transversión	51	I/T	Hidrofóbico /Polar sin carga Hidrofobicidad
EU370206-C-9218/Zg98 DQ139782-C-9218/Zg98	158	GGT/GAT Transición	53	G/D	Polar sin carga/ácido Glicina
U37760-C-YLB92	174	ATG/ATA Transición	58	M/I	Hidrofóbico/Hidrofóbico -
U37760-C-YLB92	227	AAA/AGA Transición	76	K/R	Básico/básico -
AY502058-C-Lit-1013	253	GCT/ACT Transición	85	A/T	Hidrofóbico/polar sin carga Hidrofobicidad
U37760-C-YLB92	299	TTA/TCA Transición	100	L/S	Hidrofóbico/polar sin carga Hidrofobicidad
U37760-C-YLB92	392	AAC/AGC Transición	131	N/S	Polar sin carga/polar sin carga -
AY502058-C-Lit-1013	468	GAT/GAG Transversión	156	D/E	Ácido/ácido -
AY502058-C-Lit-1013 AY502057-C-Lit-1023 AY502059-C-Lit-976	488	CTC/CCC Transición	163	L/P	Hidrofóbico/Hidrofóbico Prolina
U37760-C-YLB92 AY669145-C-Drag94	826	ACC/ATC Transición	279	T/I	Polar sin carga/Hidrofóbico Hidrofobicidad
AY502058-C-Lit-1013	894	GAG/GAT Transversión	298	E/D	Ácido/ácido -
AY669145-C-Drag94 AY502057-C-Lit-1023 AY502059-C-Lit-976	1004	AAA/AGA Transición	335	K/R	Básico/básico -
EU370206-C-9218/Zg98 DQ139782-C-9218/Zg98	1085	TTG/TGG Transversión	362	L/W	Hidrofóbico/ Hidrofóbico Aromático
U37760-C-YLB92	1097	TTT/TAC	366	F/Y	Hidrofóbico/polar sin carga Hidrofobicidad
EU370206-C-9218/Zg98 DQ139782-C-9218/Zg98 AY502058-C-Lit-1013	1143	AAT/CAT Transversión	385	N/H	Polar sin carga/básico -
U37760-C-YLB92	1196	AAC/AGC Transición	399	N/S	Polar sin carga/polar sin carga -
AY502058-C-Lit-1013	1322	AAC/AGC Transición	441	N/S	Polar sin carga/polar sin carga -

AY502060-C-Lit-957 AY502057-C-Lit-1023 AY502059-C-Lit-976	1340	GTG/GGG Transversión	447	V/G	Hidrofóbico/polar sin carga Glicina
AY502058-C-Lit-1013	1351	TGG/CGG Transición	451	W/R	Hidrofóbico/básico Hidrofobicidad, aromático
AY502058-C-Lit-1013	1549	CTT/TTT Transición	517	L/F	Hidrofóbico/ Hidrofóbico Aromático
AY502058-C-Lit-1013	1657	AGT/TGT Transversión	553	S/C	Polar sin carga/polar sin carga -
U37760-C-YLB92	1687	GCA/ACA Transición	563	A/T	Hidrofóbico/polar sin carga Hidrofobicidad
AY502058-C-Lit-1013	1739	ACT/AAT Transversión	580	T/N	Polar sin carga/polar sin carga -
AY502060-C-Lit-957 AY502057-C-Lit-1023 AY502059-C-Lit-976	1745,17 46	ACT/AAT Transversión	582	T/N	Polar sin carga/polar sin carga -

Tabla 19. Mutaciones no sinónimas (con sentido) identificadas en las secuencias de las proteínas HN del MuV con genotipo D.

No. acceso, genotipo y nombre de la cepa	Localización (nt)	Cambio de codón. Tipo de mutación	Localización (aa)	Cambio de aa	Naturaleza de la mutación y criterio de selección
EU259203-D-Zg/CRO06	16	CTC/TTC Transición	6	L/F	Hidrofóbico/ Hidrofóbico Aromático
X98874-D-London-1 X98875-D-Europe-1	34	AAT/GAT Transición	12	N/D	Polar sin carga/ácido
X98874-D-London-1 X98875-D-Europe-1	37	GCC/ACC Transición	13	A/T	Hidrofóbico/polar sin carga Hidrofobicidad
M19933-D-RW	62	ATC/AAC Transversión	21	I/N	Hidrofóbico/polar sin carga Hidrofobicidad
X98874-D-London-1	70	GCT/ACT Transición	24	A/T	Hidrofóbico/polar sin carga Hidrofobicidad
X98875-D-Europe-1	98	TTC/TAC Transversión	33	F/Y	Hidrofóbico/polar sin carga Hidrofobicidad, aromático
EU259203-D-Zg/CRO06	176	ATC/ACC Transición	59	I/T	Hidrofóbico/polar sin carga Hidrofobicidad
EU259203-D-Zg/CRO06	221, 222	AAG/AGA Transición Transición	74	K/R	Básico/básico -
X98874-D-London-1 X98875-D-Europe-1	227	AGA/AAA Transición	76	R/K	Básico/básico -
X98874-D-London-1 X98875-D-Europe-1	362	AGC/AAC Transición	121	S/N	Polar sin carga/polar sin carga -
X98874-D-London-1 X98875-D-Europe-1	389	ACA/ATA Transición	130	T/I	Polar sin carga/ Hidrofóbico Hidrofobicidad
M19933-D-RW	461	ACT/AAT Transversión	154	T/N	Polar sin carga/polar sin carga -
EU259203-D-Zg/CRO06	798	GAC/GAA Transversión	266	D/E	Ácido/ácido -

X98874-D-London-1 X98875-D-Europe-1	859	GTC/ATC Transición	287	I/V	Hidrofóbico/ Hidrofóbico
EU259203-D-Zg/CRO06	1000	GTT/ATT Transición	334	I/V	Hidrofóbico/ Hidrofóbico
X98874-D-London-1 X98875-D-Europe-1	1007	TTA/TCA Transición	336	L/S	Hidrofóbico/polar sin carga Hidrofobicidad
EU259203-D-Zg/CRO06	1051, 1052	TCA/GTA Transversión Transición	351	S/V	Polar sin carga/ Hidrofóbico Hidrofobicidad
M19933-D-RW	1110	TTC/TTA Trasversión	370	F/L	Hidrofóbico/ Hidrofóbico Aromático
EU259203-D-Zg/CRO06	1228	GTT/ATT Transición	410	V/I	Hidrofóbico/ Hidrofóbico
AY376470-D-ZgA/Cro69	1231	TTA/ATA Transición	411	L/I	Hidrofóbico/ Hidrofóbico -
EU259203-D-Zg/CRO06	1322	AAC/AGC Transición	441	N/S	Polar sin carga/polar sin carga -
EU259203-D-Zg/CRO06	1325	TCT/TTT Transición	442	S/F	Polar sin carga/ Hidrofóbico Hidrofobicidad
M19933-D-RW	1392	AAC/AAA Transversión	464	N/K	Polar sin carga/básico
EU259203-D-Zg/CRO06 AY376470-D-ZgA/Cro69	1418	ATT/ACT Transición	473	I/T	Hidrofóbico/polar sin carga Hidrofobicidad
EU259203-D-Zg/CRO06	1532	ACC/ATC Transición	511	T/I	Polar sin carga/ Hidrofóbico Hidrofobicidad
M19933-D-RW	1610	TTT/TCT Transición	537	F/S	Hidrofóbico/polar sin carga Hidrofobicidad, aromático

Tabla 20. Mutaciones no sinónimas (con sentido) identificadas en las secuencias de las proteínas HN del MuV con genotipo F.

No. acceso, genotipo y nombre de la cepa	Localización (nt)	Cambio de codón. Tipo de mutación	Localización (aa)	Cambio de aa	Naturaleza de la mutación y criterio de selección
DQ649478-F-SP EU884413-F-SP	1254	TTA/ TTT Transversión	418	L/F	Hidrofóbico/Hidrofóbico Aromático
DQ649478-F-SP/EU884413-F-SP	1391	AAC/ AGC Transición	464	N/S	Polar sin carga/Polar sin carga
DQ649478-F-SP/EU884413-F-SP	1577	AAA/ ACA Transversión	526	K/T	Básico/Polar sin carga
DQ649478-F-SP/EU884413-F-SP	1636, 1637, 1638	AAA/ TTT Transversión Transversión Transversión	546	K/F	Básico/Hidrofóbico Hidrofobicidad, aromático

Tabla 21. Mutaciones no sinónimas (con sentido) identificadas en las secuencias de las proteínas HN del MuV con genotipo G.

No. acceso, genotipo y nombre de la cepa	Localización (nt)	Cambio de codón. Tipo de mutación	Localización (aa)	Cambio de aa	Naturaleza de la mutación y criterio de selección
AF280799-G-Glouc1/UK96	35	AAT/AGT Transición	12	S/N	Polar sin carga/polar sin carga -
AF280799-G-Glouc1/UK96	62	AGC/ATC Transversión	21	I/S	Hidrofóbico/polar sin carga Hidrofobicidad
AF280799-G-Glouc1/UK96	73	AAC/GAC Transición	25	D/N	Ácido/ polar sin carga -
AF280799-G-Glouc1/UK96	110	GCA/GTA Transición	37	A/V	Hidrofóbico/ Hidrofóbico -
AF280799-G-Glouc1/UK96	385	CCT/TCT Transición	129	P/S	Hidrofóbico/polar sin carga Prolina
AF280799-G-Glouc1/UK96	457	TCA/GCA Transversión	153	S/A	Polar sin carga/ Hidrofóbico Hidrofobicidad
AF280799-G-Glouc1/UK96	1303	ATA/GTA Transición	435	I/V	Hidrofóbico/ Hidrofóbico
AF280799-G-Glouc1/UK96	1597	TCT/ACT Transversión	533	S/T	Polar sin carga/polar sin carga -

Tabla 22. Mutaciones no sinónimas (con sentido) identificadas en las secuencias de las proteínas HN del MuV con genotipo H.

No. acceso, genotipo y nombre de la cepa	Localización (nt)	Cambio de codón. Tipo de mutación	Localización (aa)	Cambio de aa	Naturaleza de la mutación y criterio de selección
AY681495-H-PetroNov	56	CCT/TCT Transición	19	S/P	Polar sin carga/ Hidrofóbico Hidrofobicidad, aromático
AF528332-H-Yeaju1498 AF528334-H-Yeaju1502	59, 60	GTT/GCC Transición Transición	20	V/A	Hidrofóbico/ Hidrofóbico -
AF528332-H-Yeaju1498 AF528334-H-Yeaju1502	201	CAG/CAT Transversión	67	Q/H	Polar sin carga/básico -
AY681495-H-PetroNov	208	TCA/GCA Transversión	70	S/A	Polar sin carga/ Hidrofóbico Hidrofobicidad
AF467767-H-88-1961	243	ATG/ATT Transversión	81	M/I	Hidrofóbico/ Hidrofóbico -
AY681495-H-PetroNov	349	ACG/TCG Transversión	117	T/S	Polar sin carga/polar sin carga -
AF528332-H-Yeaju1498 AF528334-H-Yeaju1502	798	GAC/GAA Transversión	266	D/E	Ácido/ácido -
AF528332-H-Yeaju1498	943	GAG/AAG	315	E/K	Ácido/básico

AF528334-H-Yeju1502		Transición			
AY681495-H-PetroNov	1000	GTT/ATT Transición	334	V/I	Hidrofóbico/ Hidrofóbico
AF467767-H-88-1961 EF208190-H-S-12	1133	GTA/GCA Transición	378	V/A	Hidrofóbico/ Hidrofóbico -
AY681495-H-PetroNov	1254	TTA/TTC Transversión	418	L/F	Hidrofóbico/ Hidrofóbico Aromático
AF467767-H-88-1961	1469	AGC/AAC Transición	490	S/N	Polar sin carga/polar sin carga -
AF528332-H-Yeju1498 AF528334-H-Yeju1502	1483	ATT/GTT Transición	495	I/V	Hidrofóbico/ Hidrofóbico
EF208190-H-S-12	1567	AAT/GAT Transición	523	N/D	Polar sin carga/ácido -
AF467767-H-88-1961	1586	GCC/GTC Transición	529	A/V	Hidrofóbico/ Hidrofóbico -
AY681495-H-PetroNov	1658	AGT/AAT Transición	553	S/N	Polar sin carga/polar sin carga -

Tabla 23. Mutaciones no sinónimas (con sentido) identificadas en las secuencias de las proteínas HN del MuV con genotipo I.

No. acceso, genotipo y nombre de la cepa	Localización (nt)	Cambio de codón. Tipo de mutación	Localización (aa)	Cambio de aa	Naturaleza de la mutación y criterio de selección
AY309060-I-Dg1062/Korea/98	73	AAC/GAC Transición	25	N/D	Polar sin carga/ácido -
AB003424-I-MP-93-AK D86170-I-Odate-1	205	TCT/GCT Transversión	69	S/A	Polar sin carga/ Hidrofóbico Hidrofobicidad
AB003424-I-MP-93-AK	719	AAT/ATT Transversión	240	N/I	Polar sin carga/ Hidrofóbico Hidrofobicidad
AB003424-I-MP-93-AK D86170-I-Odate-1	752	GAT/GGT Transición	251	D/G	Ácido/polar sin carga Glicina
AB003424-I-MP-93-AK D86170-I-Odate-1	1004	AAA/AGA Transición	335	K/R	Básico/básico
D86170-I-Odate-1	1447	TCC/CCC Transición	483	S/P	Polar sin carga/ Hidrofóbico Prolina
D86170-I-Odate-1	1495	TTC/TCC Transición	499	F/S	Hidrofóbico/polar sin carga Hidrofobicidad, aromático
D86170-I-Odate-1	1598	ACT/AAT Transversión	533	T/N	Polar sin carga/polar sin carga -
AB003424-I-MP-93-AK	1609	TTC/CTC Transición	537	F/L	Hidrofóbico/ Hidrofóbico Aromático
AB003424-I-MP-93-AK	1638	TTT/TTG Transversión	546	F/L	Hidrofóbico/ Hidrofóbico Aromático
AF528329-I-Dae981134 AF528330-I-KN991092 AF528335-I-CB2k1480	1745	ATT/ACT Transición	582	I/T	Hidrofóbico/polar sin carga Hidrofobicidad

III. ANÁLISIS DE MUTACIONES NO SINÓNIMAS IDENTIFICADAS EN LAS SECUENCIAS DE LA PROTEÍNA F DEL MuV AGRUPADAS POR GENOTIPOS (DE ACUERDO AL GEN SH)

Tabla 24. Mutaciones no sinónimas (con sentido) identificadas en las secuencias de las proteínas F del MuV con genotipo A.

No. de acceso, genotipo y nombre de la cepa	Localización (nt)	Cambio de nt Tipo de mutación	Localización (aa)	Cambio de aa	Naturaleza de la mutación y criterio de selección
AF201473-A-JeryLynn AF338106-A-JL5-vacuna FJ211584-A-RIT4385 FJ211585-A-RIT4385 FJ211586-A-JL1 AJ133693-A-JL-5	6	AAG/AAC Transversión	2	K/N	Básico/polar sin carga
AF345290-A-JL2-vacuna	11	TTT/TAT Transversión	4	F/Y	Hidrofóbico/polar sin carga Aromático, hidrofobicidad
AF201473-A-JeryLynn AF338106-A-JL5-vacuna FJ211584-A-RIT4385 FJ211585-A-RIT4385 FJ211586-A-JL1 AJ133693-A-JL-5	32	TTT/TAT Transversión	11	F/Y	Hidrofóbico/polar sin carga Aromático, hidrofobicidad
AF201473-A-JeryLynn AF338106-A-JL5-vacuna FJ211584-A-RIT4385 FJ211585-A-RIT4385 FJ211586-A-JL1 AJ133693-A-JL-5	71	TCT/CCT Transición	24	I/T	Hidrofóbico/polar sin carga Hidrofobicidad
AF143392-A-Kilham	106	AGG/TGG Transversión	36	R/W	Básico/Hidrofóbico Hidrofobicidad, triptófano
AF143395-A-SBL-1 D00663-A-SBL1	271, 273	GCA/AGC Transición Transversión Transversión	91	A/T	Hidrofóbico/polar sin carga Hidrofobicidad
AJ133694-A-Enders	271	GCA/ACA Transición	91	A/T	Hidrofóbico/polar sin carga Hidrofobicidad
AF143393-A-Enders	279	CCC/CCT Transición	93	P/A	Hidrofóbico/Hidrofóbico Prolina
AF345290-A-JL2-vacuna D00663-A-SBL1 AF143392-A-Kilham EF493024-A-Kilham AF143393-A-Enders AJ133694-A-Enders	530	AGC/AAC Transición	177	S/N	Polar sin carga/polar sin carga
D00663-A-SBL1	622, 623	CAG/AGG Transversión Transición	208	Q/R	Polar sin carga/básico
AF345290-A-JL2-vacuna D00663-A-SBL1	823	ATT/GTT Transición	275	I/V	Hidrofóbico/Hidrofóbico
AF143392-A-Kilham EF493024-A-Kilham	868	TAC/CAC Transición	290	Y/H	Polar sin carga/básico

AF345290-A-JL2-vacuna	977	TTG/TCG Transición	326	L/S	Hidrofóbico/polar sin carga Hidrofobicidad
AF201473-A-JerylLynn AF338106-A-JL5-vacuna FJ211584-A-RIT4385 FJ211585-A-RIT4385 FJ211586-A-JL1 AJ133693-A-JL-5	993	ATA/ATG Transición	331	I/M	Hidrofóbico/Hidrofóbico
D00663-A-SBL1	1043, 1044	TGC/TCG Transversión Transversión	348	C/S	Polar sin carga/polar sin carga
D00663-A-SBL1	1045	CTT/GTT Transversión	349	L/V	Hidrofóbico/Hidrofóbico
D00663-A-SBL1 AJ133694-A-Enders	1078	CCT/TCT Transición	360	P/S	Hidrofóbico/polar sin carga Hidrofobicidad
AF201473-A-JerylLynn AF338106-A-JL5-vacuna FJ211584-A-RIT4385 FJ211585-A-RIT4385 FJ211586-A-JL1	1291	GCT/ACT Transición	431	A/T	Hidrofóbico/polar sin carga Hidrofobicidad
AJ133694-A-Enders	1328	AAT/ACT Transversión	443	N/T	Polar sin carga/polar sin carga
AF201473-A-JerylLynn AF338106-A-JL5-vacuna FJ211584-A-RIT4385 FJ211585-A-RIT4385 FJ211586-A-JL1 AJ133693-A-JL-5	1429	GTT/TTT Transversión	477	V/F	Hidrofóbico/Hidrofóbico Aromático
AF201473-A-JerylLynn AF338106-A-JL5-vacuna FJ211584-A-RIT4385 FJ211585-A-RIT4385 FJ211586-A-JL1 AJ133693-A-JL-5	1438	AGT/GGT Transición	480	S/G	Polar sin carga/polar sin carga Glicina
AF201473-A-JerylLynn AF338106-A-JL5-vacuna FJ211584-A-RIT4385 FJ211585-A-RIT4385 FJ211586-A-JL1 AJ133693-A-JL-5	1475	GCA/TCA Transición	489	A/S	Hidrofóbico/polar sin carga Hidrofobicidad
D00663-A-SBL1	1517	TGC/TTC Transversión	506	C/F	Polar sin carga/Hidrofóbico Hidrofobicidad, aromático
AJ133694-A-Enders	1598	GAT/GGT Transición	533	D/G	Ácido/polar sin carga Glicina

TABLA 25. Mutaciones no sinónimas (con sentido) identificadas en las secuencias de las proteínas F del MuV con genotipo B.

No. de acceso, genotipo y nombre de la cepa	Localización (nt)	Cambio de nt Tipo de mutación	Localización (aa)	Cambio de aa	Naturaleza de la mutación y criterio de selección
AB040874-B-Miyahara NC_002200-B-Miyahara X15285 Miyahara	8	GCT/GTT Transición	3	A/V	Hidrofóbico/Hidrofóbico

vacuna					
AB470486 Hoshino vacuna	23	TGC/TAC Transición	8	C/Y	Polar sin carga/polar sin carga
AB040874-B-Miyahara NC_002200-B-Miyahara X15285 Miyahara vacuna AB470486 Hoshino vacuna AB003413-B-MP-77-M AB003421-B-MP-77-T AB003423-B-MP-80-J AB003420-B-MP-80-M	28	AGC/GGC Transición	10	S/G	Polar sin carga/polar sin carga Glicina
AB470486 Hoshino vacuna	40	TTT/CTT Transición	14	F/L	Hidrofóbico/Hidrofóbico Aromático
AB003422-B-MP-89-K AB003416-B-MP-85-S AB003418-B-MP-89-OI AB003419-B-MP-89-OS	43	TCA/ACA Transversión	15	S/T	Polar sin carga/polar sin carga
AB003426-B-MP-77-SU	46	TCT/GCT Transversión	16	S/A	Polar sin carga/Hidrofóbico Hidrofobicidad
AB003426-B-MP-77-SU	80	CAA/CGA Transición	27	Q/R	Polar sin carga/básico
AB003416-B-MP-85-S AB003419-B-MP-89-OS	95	AAG/AGG Transición	32	K/R	Básico/básico
AB003412-B-MP76-S	115	AGC/GGC Transición	39	S/G	Polar sin carga/polar sin carga Glicina
AB003412-B-MP76-S	164	CCG/CAG Transversión	55	P/Q	Hidrofóbico/polar sin carga Prolina
X82887-B-UrabeAm9- BS-F AF314558-B-SIPAR-02 AF314559-B-Urabe- Smith-Kline AF314560 871004 AF314561-B-Biken AF314562 871005 FJ375177-B-Urabe- 1004-10/2	179	ACT/ATT Transición	60	T/I	Polar sin carga/Hidrofóbico Hidrofobicidad
X82887-B-UrabeAm9- BS-F	197	TTT/TCT Transición	66	F/S	Hidrofóbico/polar sin carga Hidrofobicidad, aromativo
AB003413-B-MP-77-M AB003421-B-MP-77-T AB003423-B-MP-80-J AB003420-B-MP-80-M AB003422-B-MP-89-K AB003416-B-MP-85-S AB003418-B-MP-89-OI AB003419-B-MP-89-OS AB003426-B-MP-77-SU	236	TTG/TCG Transición	79	L/S	Hidrofóbico/polar sin carga Hidrofobicidad
FJ375177-B-Urabe- 1004-10/2 AB003421-B-MP-77-T AB003426-B-MP-77-SU	272	GCA/GTA Transición	91	A/V	Hidrofóbico/Hidrofóbico
AB003421-B-MP-77-T	336	GCG/GCC Transversión	112	A/P	Hidrofóbico/Hidrofóbico Prolina
AB003412-B-MP76-S	423	AAA/AAC Transversión	141	K/N	Básico/polar sin carga

AB003412-B-MP76-S	424	AAT/GAT Transición	142	N/D	Polar sin carga/ácido
AB003412-B-MP76-S	437	GCA/GGA Transición	146	A/G	Hidrofóbico/polar sin carga Hidrofobicidad, glicina
AB003412-B-MP76-S	445	CGA/GGA Transversión	149	R/G	Básico/polar sin carga Glicina
AB003422-B-MP-89-K	473	ACT/ATT Transversión	158	T/I	Polar sin carga/Hidrofóbico Hidrofobicidad
AB040874-B-Miyahara NC_002200-B-Miyahara X15285 Miyahara vacuna	479	CAG/CGG Transición	160	Q/R	Polar sin carga/básico
AF314558-B-SIPAR-02 AF314559-B-Urabe- Smith-Kline AF314560 871004 AF314561-B-Biken AF314562 871005 FJ375177-B-Urabe- 1004-10/2	584	TCC/TTC Transversión	195	S/F	Polar sin carga/Hidrofóbico Hidrofobicidad, aromático
AB003420-B-MP-80-M	655	ATT/CTT Transversión	219	I/L	Hidrofóbico/Hidrofóbico
AB003413-B-MP-77-M	663	ATA/ATG Transición	221	I/M	Hidrofóbico/Hidrofóbico
X82887-B-UrabeAm9- BS-F AF314558-B-SIPAR-02 AF314559-B-Urabe- Smith-Kline AF314560 871004 AF314561-B-Biken AF314562 871005 FJ375177-B-Urabe- 1004-10/2	736	GCT/ACT Transición	246	A/T	Hidrofóbico/polar sin carga Hidrofobicidad
AB003425-B-MP-77-SA	805	ATG/GTG Transición	269	M/V	Hidrofóbico/Hidrofóbico
AB003422-B-MP-89-K AB003425-B-MP-77-SA	880	AGC/GGC Transición	294	S/G	Polar sin carga/polar sin carga Glicina
AB003423-B-MP-80-J AB003412-B-MP76-S	889	AAT/CAT Transversión	297	N/H	Polar sin carga/básico
AB003426-B-MP-77-SU	984	AGA/AGC Transversión	328	R/S	Básico/polar sin carga
AB003418-B-MP-89-OI AB003419-B-MP-89-OS	1057	ATA/GTA Transición	353	I/V	Hidrofóbico/Hidrofóbico
X82887-B-UrabeAm9- BS-F AF314558-B-SIPAR-02 AF314559-B-Urabe- Smith-Kline AF314560 871004 AF314561-B-Biken AF314562 871005 FJ375177-B-Urabe- 1004-10/2	1108,1109	GTA/ACG	370	V/T	Hidrofóbico/polar sin carga Hidrofobicidad
AB470486 Hoshino vacuna	1148	CTA/CAA Transversión	383	L/Q	Hidrofóbico/polar sin carga Hidrofobicidad
AB003419-B-MP-89-OS	1147	CTA/GTA Transversión	383	L/V	Hidrofóbico/Hidrofóbico

AB003426-B-MP-77-SU	1151	ACG/ATG Transición	384	T/M	Polar sin carga/Hidrofóbico Hidrofobicidad
X82887-B-UrabeAm9-BS-F AF314558-B-SIPAR-02 AF314559-B-Urabe-Smith-Kline AF314560 871004 AF314561-B-Biken AF314562 871005 FJ375177-B-Urabe-1004-10/2	1166	AGT/AAT Transición	389	S/N	Polar sin carga/polar sin carga
AB003422-B-MP-89-K	1309	TCA/GCA Transversión	437	S/A	Polar sin carga/Hidrofóbico Hidrofobicidad
AB003422-B-MP-89-K	1414	CAT/TAT Transición	472	H/Y	Básico/polar sin carga
AB040874-B-Miyahara NC_002200-B-Miyahara X15285 Miyahara vacuna	1433	AGT/AAT Transición	478	S/N	Polar sin carga/polar sin carga
AB003412-B-MP76-S AB003425-B-MP-77-SA	1465	GCA/TCA Transversión	489	A/S	Hidrofóbico/polar sin carga Hidrofobicidad
AB003426-B-MP-77-SU AB003412-B-MP76-S AB003425-B-MP-77-SA	1496	ATC/AGC Transversión	499	I/S	Hidrofóbico/polar sin carga Hidrofobicidad
AB003418-B-MP-89-OI AB003419-B-MP-89-OS	1498	ATT/GTT Transición	500	I/V	Hidrofóbico/Hidrofóbico
AB003425-B-MP-77-SA	1504	CTA/GTA Transversión	502	L/V	Hidrofóbico/Hidrofóbico
AB003412-B-MP76-S	1507	TTG/ATG Transversión	503	L/M	Hidrofóbico/Hidrofóbico
AB040874-B-Miyahara NC_002200-B-Miyahara X15285 Miyahara vacuna	1528	ATT/GTT Transición	510	I/V	Hidrofóbico/Hidrofóbico

Tabla 26. Mutaciones no sinónimas (con sentido) identificadas en las secuencias de las proteínas F del MuV con genotipo C.

No. de acceso, genotipo y nombre de la cepa	Localización (nt)	Cambio de nt Tipo de mutación	Localización (aa)	Cambio de aa	Naturaleza de la mutación y criterio de selección
AF143388-C-V27	13	CCA/TCA Transición	5	P/S	Hidrofóbico/polar sin carga Hidrofobicidad, prolina
AF143388-C-V27	13	CCA/CTA Transición	5	P/L	Hidrofóbico/Hidrofóbico
AY669145-C-Drug94	16	GTT/ATT Transición	6	V/I	Hidrofóbico/Hidrofóbico
AF143388-C-V27 AY669145-C-Drug94	28	GGC/AGC Transición	10	G/S	Polar sin carga/polar sin carga
AF143390-C-V31	172	CAA/AAA Transversión	58	Q/K	Polar sin carga/básico
AF143388-C-V27	183	GAT/GAG	61	D/E	Ácido/ácido

		Transversión			
AY502056-C-Lit-1013	234	AAT/AAC Transición	77	S/R	Polar sin carga/básico
AF143391-C-V34	236	TTG/TGG Transversión	79	L/W	Hidrofóbico/Hidrofóbico Aromático
AF143388-C-V27	274,275	TGC/TCG Transversión Transversión	92	S/P	Polar sin carga/Hidrofóbico Hidrofobicidad, prolina
AY502055-C-Lit-957 AY502061-C-Lit-976	283	CCC/TCC Transición	95	P/S	Hidrofóbico/polar sin carga Hidrofobicidad, prolina
AY502056-C-Lit-1013	292	AGA/GGA Transición	98	R/G	Básico/polar sin carga
AY502055-C-Lit-957	344	GTT/GGT Transversión	115	V/G	Hidrofóbico/polar sin carga Hidrofobicidad, glicina
EU370206-C-9218/Zg98	373	GTC/ATC Transición	125	V/I	Hidrofóbico/Hidrofóbico
AF143388-C-V27	376	TCA/ACA Transversión	126	S/T	Polar sin carga/polar sin carga
AY502055-C-Lit-957	408	GCA/GAG Transversión	136	A/E	Hidrofóbico/ácido Hidrofobicidad
AY502056-C-Lit-1013 AY502061-C-Lit-976	409	ATA/CTA Transversión	137	I/L	Hidrofóbico/Hidrofóbico
AF143391-C-V34	410	ATA/AAA Transversión	137	I/K	Hidrofóbico/básico Hidrofobicidad
AY502056-C-Lit-1013	423	AAA/AAT Transversión	141	K/N	Básico/Polar sin carga
AY502055-C-Lit-957 AY502061-C-Lit-976 EU370206-C-9218/Zg98	446	CGG/CAG Transición	149	R/Q	Básico/polar sin carga
AY502061-C-Lit-976	449,450	GCA/GGT Transversión Transversión	150	A/G	Hidrofóbico/polar sin carga Hidrofobicidad, glicina
AY502061-C-Lit-976	457, 459	GAA/AAG Transición Transición	153	E/K	Ácido/básico Donador o aceptor de EPH
AY502056-C-Lit-1013 AY502055-C-Lit-957 AY502061-C-Lit-976	461,462	TGA/AAA Transversión Transición	154	V/E	Hidrofóbico/ácido Hidrofobicidad
AY502056-C-Lit-1013	477	CAA/CAT Transversión	159	Q/H	Polar sin carga/básico
AY502056-C-Lit-1013	480	CAG/CAT Transversión	160	L/V	Hidrofóbico/Hidrofóbico
AY502061-C-Lit-976	493,494	GTA/GGA Transversión	165	V/G	Hidrofóbico/polar sin carga Hidrofobicidad, glicina
AF143388-C-V27	502	ATA/CTA Transversión	168	I/L	Hidrofóbico/Hidrofóbico
AY502055-C-Lit-957	525	ATT/ATG Transversión	175	I/M	Hidrofóbico/Hidrofóbico
AF143391-C-V34 AF143390-C-V31	536	CAA/CCA Transversión	179	G/P	Polar sin carga/Hidrofóbico Glicina, prolina
AF143390-C-V31	541	AAC/TAC Transversión	181	N/Y	Polar sin carga/polar sin carga
AY502061-C-Lit-976 AF143391-C-V34	584	TCC/TTC Transición	195	S/F	Polar sin carga/Hidrofóbico Hidrofobicidad, aromático
AF143389-C-V29	629	CAA/CCA Transversión	210	Q/P	Polar sin carga/Hidrofóbico Hidrofobicidad, prolina
AF143389-C-V29	640	CCG/TCG	214	P/S	Hidrofóbico/polar sin carga

		Transición			Hidrofobicidad, prolina
AF143389-C-V29	650	CAC/TAC Transición	217	S/L	Polar sin carga/Hidrofóbico Hidrofobicidad
AF143389-C-V29	665	CAA/CCA Transversión	222	Q/P	Polar sin carga/Hidrofóbico Hidrofobicidad, prolina
AF143391-C-V34	677	TCT/TGT Transversión	226	S/C	Polar sin carga/polar sin carga
AF143389-C-V29	773,774	CAG/CTA Transversión Transición	258	Q/L	Polar sin carga/Hidrofóbico Hidrofobicidad
EU370206-C-9218/Zg98	813	TTA/TCA Transición	278	I/V	Hidrofóbico/Hidrofóbico
AF143388-C-V27	952	AGC/GGC Transición	318	S/G	Polar sin carga/polar sin carga
AY502056-C-Lit-1013	1019	AGG/AAG Transición	340	R/K	Básico/básico
AY502061-C-Lit-976	1030,1031 ,1032	GAA/ACG Transición Transversión Transición	344	E/T	Ácido/polar sin carga
EU370206-C-9218/Zg98	1172	TCT/TTT Transición	391	S/F	Polar sin carga/Hidrofóbico Hidrofobicidad, aromático
AY502055-C-Lit-957 AY502061-C-Lit-976 AY669145-C-Drag94	1174	TAT/CAT Transición	392	Y/H	Polar sin carga/básico
AF143391-C-V34	1241	TCC/TGC Tranversión	414	S/C	Polar sin carga/polar sin carga
AF143391-C-V34	1256	GAT/GGT Transición	419	D/G	Ácido/polar sin carga Glicina
AF143391-C-V34	1279	AAC/GAC Transición	427	N/D	Polar sin carga/ácido
AF143391-C-V34	1327	AAT/CAT Transversión	443	N/H	Polar sin carga/básico
AF143391-C-V34	1367	GTT/GGT Transversión	456	V/G	Hidrofóbico/ polar sin carga Hidrofobicidad, glicina
AF143391-C-V34 AF143390-C-V31	1372	GCA/TCA Transversión	458	A/S	Hidrofóbico/polar sin carga Hidrofobicidad
AY669145-C-Drag94	1395	AAG/AAT Transversión	465	K/N	Básico/polar sin carga
AF143391-C-V34	1406	GAG/GGG Transición	469	E/G	Ácido/polar sin carga Glicina
AF143391-C-V34	1411	AAC/GAC Transición	471	N/D	Polar sin carga/ácido
AF143388-C-V27 AF143389-C-V29	1426	TCT/ACT Transversión	476	S/T	Polar sin carga/polar sin carga
AF143391-C-V34	1454	GCT/GGT Transversión	485	A/G	Hidrofóbico/polar sin carga Hidrofobicidad, glicina
AY502055-C-Lit-957	1457	ATA/AAA Transversión	486	I/K	Hidrofóbico/básico Hidrofobicidad
AF143391-C-V34 AF143390-C-V31	1462	GTA/TTA Transversión	488	V/L	Hidrofóbico/Hidrofóbico
AF143388-C-V27 AF143389-C-V29 AF143391-C-V34 AF143390-C-V31	1469	GCC/GGC Transversión	490	A/G	Hidrofóbico/polar sin carga Hidrofobicidad, polar sin carga
AF143389-C-V29	1481	AGC/ATC Transversión	494	S/I	Polar sin carga/Hidrofóbico Hidrofobicidad

AF143388-C-V27 AF143389-C-V29 AF143391-C-V34 AF143390-C-V31	1494	ATG/ATT Transversión	498	M/I	Hidrofóbico/Hidrofóbico
AF143388-C-V27	1504	CTA/GTA Transversión	502	L/V	Hidrofóbico/Hidrofóbico
AF143388-C-V27	1543	ATC/TTC Transversión	515	I/F	Hidrofóbico/Hidrofóbico Aromático
AF143389-C-V29	1556	AAC/ATC Transversión	519	N/I	Polar sin carga/Hidrofóbico Hidrofobicidad
AY502056-C-Lit-1013	1561	AAA/CAA Transversión	521	K/Q	Básico/polar sin carga

Tabla 27. Mutaciones no sinónimas (con sentido) identificadas en las secuencias de las proteínas F del MuV con genotipo D.

No. de acceso, genotipo y nombre de la cepa	Localización (nt)	Cambio de nt Tipo de mutación	Localización (aa)	Cambio de aa	Naturaleza de la mutación y criterio de selección
AY376470-D-ZgA/Cro69 M17142-D-RW	16	ATT/GTT Transición	6	I/V	Hidrofóbico/Hidrofóbico
AF143387-D-V8 AF143386-D-V7	299	CAT/CTT Transversión	100	H/L	Básico/Hidrofóbico Hidrofobicidad
AF143383-D-V1	314	GGC/GCC Transversión	105	A/G	Hidrofóbico/polar sin carga Hidrofobicidad, glicina
AF143383-D-V1	326,327	GGC/GCT Transversión Transición	109	A/G	Hidrofóbico/polar sin carga Hidrofobicidad, glicina
AF143383-D-V1	416	GCG/GTG Transición	139	A/V	Hidrofóbico/Hidrofóbico
M17142-D-RW	451	GTC/ATC Transición	151	V/I	Hidrofóbico/Hidrofóbico
AF143387-D-V8	502,503	ATC/CTA Transversión Transversión	168	I/L	Hidrofóbico/Hidrofóbico
AF143384-D-V4	508	GAC/TAC Transversión	170	D/Y	Polar sin carga/polar sin carga
AF143383-D-V1	580	ACC/GCC Transición	194	T/A	Polar sin carga/Hidrofóbico Hidrofobicidad
M17142-D-RW	584	TCC/TAC Transversión	195	S/Y	Polar sin carga/polar sin carga
AF143383-D-V1	680	TTG/TGG Transversión	227	L/W	Hidrofóbico/Hidrofóbico Aromático
AF143387-D-V8	688	AGT/GGT Transición	230	S/G	Polar sin carga/polar sin carga Glicina
AF143383-D-V1	746	ATA/AAA Transversión	249	I/K	Hidrofóbico/básico Hidrofobicidad
AF143384-D-V4	785	GTT/GAT Transversión	262	V/D	Hidrofóbico/polar sin carga Hidrofobicidad
AF143387-D-V8	952	AGC/GGC Transición	318	S/G	Polar sin carga/polar sin carga Glicina
AF143387-D-V8	1292, 1293	CTG/TGG Transición	431	A/V	Hidrofóbico/Hidrofóbico

		Transversión			
AF143386-D-V7	1388	GCC/GAC Transversión	463	A/D	Hidrofóbico/ácido Hidrofobicidad
AF143387-D-V8	1420	CTC/ATC Transversión	474	L/I	Hidrofóbico/Hidrofóbico
AF143384-D-V4	1426,1427	TCT/ATT Transversión Transición	476	S/I	Polar sin carga/Hidrofóbico Hidrofobicidad
AY376470-D-ZgA/Cro69	1504	CTA/ATA Transversión	502	L/I	Hidrofóbico/Hidrofóbico
AF143384-D-V4	1549,1550 ,1551	AGA/GAG Transición	517	R/E	Básico/ácido Por la formación de EPH

Tabla 28. Mutaciones no sinónimas (con sentido) identificadas en las secuencias de las proteínas F del MuV con genotipo G.

No. de acceso, genotipo y nombre de la cepa	Localización (nt)	Cambio de nt Tipo de mutación	Localización (aa)	Cambio de aa	Naturaleza de la mutación
AB085223-G-SA718/Ja01 AB085224 SA856/Ja01	44	TCA/TTA Transición	15	S/L	Polar sin carga/Hidrofóbico Hidrofobicidad
EU370207-G-Du/CRO05 AF280799-G-Glouc1/UK96	53	ACA/ATA Transición	18	T/I	Polar sin carga/Hidrofóbico Hidrofobicidad
AB085216-G-SA702/Ja99 AB085222-G-SA208/Ja01	52	ACA/GCA Transición	18	T/A	Polar sin carga/Hidrofóbico Hidrofobicidad
AB085225-G-SA925/Ja01	95	AAG/AGG Transición	32	K/R	Básico/básico Formación de EPH
AF280799-G-Glouc1/UK96	222	AAG/AAT Transversión	74	K/N	Básico/polar sin carga
AB085220-G-SA963/Ja00	584	TCC/TTC Transición	195	S/F	Polar sin carga/Hidrofóbico Aromático
AB085218-G-SA456/Ja00	663	ATA/ATG Transición	221	I/M	Hidrofóbico/Hidrofóbico
AB085216-G-SA702/Ja99	834	ATT/ATG Transversión	278	I/M	Hidrofóbico/Hidrofóbico
EU370207-G-Du/CRO05	988	CAC/AAC Transversión	330	H/N	Básico/polar sin carga
EU370207-G-Du/CRO05	1361	GCA/TCA Transversión	454	S/I	Polar sin carga/Hidrofóbico Hidrofobicidad
AB085218-G-SA456/Ja00	1396	TAC/CAC Transición	466	Y/H	Polar sin carga/básico
AF280799-G-Glouc1/UK96	1403	AAG/AGG Transición	468	K/R	Básico/básico
AF280799-G-Glouc1/UK96	1483	ATC/GTC Transición	495	I/V	Hidrofóbico/Hidrofóbico
EU370207-G-Du/CRO05	1494	ATT/ATG Transversión	498	I/M	Hidrofóbico/Hidrofóbico
AB085216-G-SA702/Ja99	1594	GTC/ATC Transición	532	V/I	Hidrofóbico/Hidrofóbico

EU370207-G-Du/CRO05	1613	TAC/TCC Transversión	538	Y/S	Polar sin carga/polar sin carga
---------------------	------	-------------------------	-----	-----	---------------------------------

Tabla 29. Mutaciones no sinónimas (con sentido) identificadas en las secuencias de las proteínas F del MuV con genotipo H.

No. de acceso, genotipo y nombre de la cepa	Localización (nt)	Cambio de nt Tipo de mutación	Localización (aa)	Cambio de aa	Naturaleza de la mutación y criterio de selección
AF467767-H-88-1961	20	ACT/ATT Transición	7	T/I	Polar sin carga/Hidrofóbico Hidrofobicidad
DQ525022-H-S-12(RS-12)	807	ATG/ATA Transición	269	M/I	Hidrofóbico/Hidrofóbico

Tabla 30. Mutaciones no sinónimas (con sentido) identificadas en las secuencias de las proteínas F del MuV con genotipo I.

No. de acceso, genotipo y nombre de la cepa	Localización (nt)	Cambio de nt Tipo de mutación	Localización (aa)	Cambio de aa	Naturaleza de la mutación y criterio de selección
AB003424-I-MP-93-AK AY309060-I- Dg1062/Korea/98	14,15	TCA/TTT Transición Transversión	5	S/F	Polar sin carga/Hidrofóbico Hidrofobicidad, fenilalanina
AB003424-I-MP-93-AK AY309060-I- Dg1062/Korea/98	52	ATA/GAT Transición	18	I/V	Hidrofóbico/Hidrofóbico
AB003424-I-MP-93-AK AY309060-I- Dg1062/Korea/98	65	ACC/ATC Transición	22	T/I	Polar sin carga/Hidrofóbico Hidrofobicidad
AB003424-I-MP-93-AK AY309060-I- Dg1062/Korea/98	183	GAG/GAT Transversión	61	E/D	Ácido/Ácido
AB003424-I-MP-93-AK AY309060-I- Dg1062/Korea/98	236	TCG/TTG Transición	79	S/L	Polar sin carga/Hidrofóbico Hidrofobicidad
AB003424-I-MP-93-AK AY309060-I- Dg1062/Korea/98	274	TCG/CCG Transición	92	S/P	Polar sin carga/Hidrofóbico Hidrofobicidad, prolina
AB003424-I-MP-93-AK AY309060-I- Dg1062/Korea/98	283	CCT/ACT Transversión	95	P/T	Hidrofóbico/Polar sin carga Hidrofobicidad
AB003424-I-MP-93-AK AY309060-I- Dg1062/Korea/98	425,426	AAT/ACC Transversión Transición	142	N/T	Polar sin carga/Polar sin carga
AB003424-I-MP-93-AK AY309060-I- Dg1062/Korea/98	584	TCC/TTC Transición	195	S/F	Polar sin carga/Hidrofóbico Hidrofobicidad, aromático
AB003424-I-MP-93-AK AY309060-I- Dg1062/Korea/98	933	GAG/GAT Transversión	311	E/D	Ácido/Ácido

AB003424-I-MP-93-AK AY309060-I- Dg1062/Korea/98	1139	TGT/TAT Transición	380	C/Y	Polar sin carga/Polar sin carga
AB003424-I-MP-93-AK AY309060-I- Dg1062/Korea/98	1252	ATG/TTG Transversión	418	M/L	Hidrofóbico/Hidrofóbico
AB003424-I-MP-93-AK AY309060-I- Dg1062/Korea/98	1333	CAA/AAA Transversión	445	Q/K	Polar sin carga/Básico
AB003424-I-MP-93-AK AY309060-I- Dg1062/Korea/98	1415	CAT/CGT Transición	472	H/R	Básico/Básico

Tabla 31. Mutaciones no sinónimas (con sentido) identificadas en las secuencias de las proteínas F del MuV con genotipo K.

No. de acceso, genotipo y nombre de la cepa	Localización (nt)	Cambio de nt Tipo de mutación	Localización (aa)	Cambio de aa	Naturaleza de la mutación y criterio de selección
AB003415-K-MP-93-N AB085227-K- SA967/Ja99	1474,1476	GTT/ATC Transversión Transición	492	V/I	Hidrofóbico/Hidrofóbico
AB003415-K-MP-93-N AB085227-K- SA967/Ja99	1568	ACT/AAT Transversión	523	T/N	Polar sin carga/Polar sin carga
AB003415-K-MP-93-N AB085227-K- SA967/Ja99	1582	ATA/TTA Transversión	528	I/L	Hidrofóbico/Hidrofóbico