



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA
SALUD ANIMAL

DETECCIÓN DE RECEPTORES SIALIL ALFA 2,3 Y SIALIL ALFA 2,6 EN
CÉLULAS MDCK Y A549 Y SU RELACIÓN CON LA CAPACIDAD INFECTIVA DE
VIRUS DE INFLUENZA PORCINA MEXICANOS

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

PRESENTA:

MARÍA JOSÉ MARTÍNEZ MERCADO

TUTOR PRINCIPAL

JOSÉ IVAN SÁNCHEZ BETANCOURT
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

COMITÉ TUTOR

LEONOR HUERTA HERNÁNDEZ
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS
HUMBERTO RAMÍREZ MENDOZA
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX

AGOSTO 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas

Tesis Digitales

Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DEDICATORIAS

A mi querido esposo Rodolfo, mi *hon*. Gracias por el gran amor incondicional; el enorme, constante y siempre seguro apoyo. Eres mi *khal* que me prometió los siete reinos y lo ha cumplido con más, muchísimo más y pensar que aún nos faltan cosas por vivirlo. Te amo tanto y a diario agradezco a la vida por tenerte como mi esposo, mi soporte; quien siempre se preocupa por mi bienestar y me motiva a ser y hacer mi felicidad. ¡Gracias totales! Este camino no fue nada fácil pero contar con tu solidaridad en cada momento definitivamente lo hizo posible. TE AMO. *"If this is just the beginnin' my life is gonna be bee-yoo-tee-ful"*.

A mis padres, María y Miguel. No me bastaría la vida para agradecerles esta encomiable labor que como padre y madre han desempeñado durante toda mi vida. Valoro y reconozco cada uno de los esfuerzos que les he visto realizar por mí, por nuestra familia. Desde el momento en que supieron que venía en camino y que sé que dichos esfuerzos de ninguna manera han llegado a su fin con la familia que he formado. Ya que siempre sé que cuento (contamos) con ustedes, con su cobijo y su apoyo. Desde permitirme el techo hasta favorecerme con su consejo y su apapacho. Sin su apoyo y su contribución, pero sobretodo su amor profesado, simplemente me hubiera sido difícil lograrlo. Por ustedes y para ustedes. LOS AMO MUCHÍSIMO.

A mi compañera de aventuras, mi Matilda. Quizá nunca lo sepas, pero eres amor e inspiración, de lo más puro que pueda existir. Te quiero mi bonita.

AGRADECIMIENTOS

A mi tutor Dr. Iván Sánchez. Por brindarme la oportunidad de ser parte de su equipo de investigación, por su asesoría y tutoría pero principalmente por tener siempre la disposición absoluta de contribuir al máximo para desarrollar este proyecto siempre accediendo a mis peticiones para hacer posible la obtención de resultados. Gracias doctor.

A los miembros de mi comité tutorial: Dra. Leonor Huerta y Dr. Humberto Ramírez. Gracias por ser parte de mi formación así como por sus contribuciones para la culminación de este proyecto. A la **Dra. Leonor** por el apoyo fundamental proporcionado para la determinación de la expresión de los receptores de ácido siálico en las líneas celulares. Al **Dr. Humberto** por las facilidades otorgadas en el uso del microscopio de fluorescencia para la obtención de las micrografías de este trabajo.

Al grupo de investigación del Departamento de Medicina y Zootecnia de Cerdos: Iván Sánchez, René Segura, Jaqueline Cervantes, Rebeca Martínez, Manuel Saavedra, María Josefina Contreras, Mariana Pérez, Carmen Gaitán, Saúl Félix, Mariana García, Guadalupe Chávez, Alef González, Brenda Maya y Ana Gabriela López. Gracias por su apoyo técnico, moral y por esos seminarios tan enriquecedores.

A la Dra. Rebeca Martínez. Gracias por todo el apoyo y la asesoría en el manejo del cultivo celular así como en las técnicas de Biología Molecular. Por ser la guía que desde el día en que nos conocimos has sido para mí, no sólo eres mi gurú en el trabajo en el laboratorio además eres una de las personas más valiosas que he conocido y que puedo decir es mi amiga.

A la ‘futura M en C’ Carmen Gaitán. Gracias por tu apoyo en la replicación viral en embrión de pollo y por tu disposición para ayudarme siempre que lo necesité. Por ser un apoyo en todo momento y por hacer más agradables los momentos de trabajo, así como por siempre tener un buen consejo y una actitud motivadora.

A los doctores Manuel Saavedra y Onasis Vicente, mis compañeros del grupo de Influenza. Gracias por su disposición para atender mis dudas e inquietudes en todo

momento. Manuel gracias por el apoyo y acompañamiento en el complicado proceso de la RT-PCR. Onasis gracias por tu apoyo en las técnicas para la determinación de la expresión del ácido siálico en las líneas celulares.

Al personal del Departamento de Medicina y Zootecnia de Cerdos. A la **Dra. Carmen Mercado** por ser mi mentora en el Área de Virología y por la disposición para asesorarme y sobretodo apoyarme siempre que lo necesité. A los **doctores Mario Haro y Alejandra Mercadillo** quienes desde que llegué al DMZC han sido realmente acogedores conmigo siendo desde entonces figuras muy importantes para mí, gracias también por permitirme dar clase en sus grupos. A la **Dra. Rosalba Carreón** por contribuir a mi formación en el área de Virología atendiendo mis dudas y asesorándome cuando se lo solicité, así como por sus observaciones como miembro de mi jurado. A la **Dra. Esperanza Galván** por su apoyo dentro del laboratorio y por siempre tener un comentario acertado e invariablemente ofrecerme una sonrisa. Al **Sr. Inocente Lara** por su apoyo técnico en la preparación de los insumos utilizados en este trabajo y por supuesto, por nuestras pláticas y risas que siempre hicieron un mejor día dentro del laboratorio.

A la Dra. Susana Mendoza. Por sus observaciones realizadas como miembro de mi jurado.

Este proyecto fue posible gracias al financiamiento **PAPIIT IN223514** “Determinación de la capacidad infecciosa de virus de influenza porcinos en células humanas” y parcialmente apoyado por **CONACYT 254244 CB-2015**.

ABSTRACT

Swine influenzaviruses have been under the spotlight during the last decades due to pigs and human interspecies infections. These interactions are possible due to swine have cellular sialic acid receptors susceptibles to get infected by avian and human origin influenzaviruses which can lead to reassortant viruses. In 2009, H1N1pdm09 pandemic reassortant virus emerged in Mexico which pig origin had been attributed since then. Months after this, different swine influenzaviruses were isolated from several Mexican farms collected through the country at the Departamento de Medicina y Zootecnia de Cerdos (DMZC-UNAM). Complete genome sequencing resulted in avian, swine and human origin influenzaviruses genes. The main objective of this work was to evaluate the capability of Mexican swine influenzaviruses to infect human cells through a cell culture *in vitro* assay. As a first approach sialic acids α 2,3 and α 2,6 cellular receptors were identified by specific lectins *Maackia amurensis* and *Sambucus nigra* in A549 (human lung adenocarcinoma) and MDCK (dog kidney) cell lines, posing affinity for swine influenzaviruses infection. The second approach was to evaluate the Mexican swine influenzaviruses infective dynamics: *A/swine/Mexico/Ver37/2010* (H1N1), *A/swine/Mexico/Mex52/2010* (H1N1), *A/swine/Mexico/Mich40/2010* (H3N2) and *A/swine/Mexico/Mex51/2010* (H3N2), through cell culture supernatants we used real-time RT-PCR quantification and hemagglutinating titre at 24, 48 and 72 hpi as well as cytopathic effect observation. A549 cells were susceptible to porcine viruses infection. The highest viral titers were obtained from MDCK cells. Our results shown that the Mexican swine influenzaviruses had different dynamics in which *A/swine/Mexico/Mex51/2010* (H3N2) was the most virulent.

RESUMEN

Los influenzavirus porcinos han llamado la atención durante las últimas décadas debido a las infecciones interespecie que se han presentado entre cerdos y humanos. Estas interacciones son posibles gracias a que los cerdos poseen receptores celulares de ácido siálico que les confieren la susceptibilidad para ser infectados por influenzavirus aviáres y de origen humano lo que puede generar virus rearrreglantes. En el año 2009 surge en México un virus rearrreglante pandémico H1N1pdm09, cuyo origen en el cerdo es atribuido. En meses posteriores, en el Departamento de Medicina y Zootecnia de Cerdos (DMZC-UNAM) se aislaron diferentes virus de influenza porcina a partir de muestras de diversas granjas del país. La secuenciación del genoma completo de dichos virus resulta en genes de origen aviar, porcino y humano. El objetivo del presente trabajo fue evaluar el riesgo de infección de células humanas con los virus de influenza porcina aislados en el DMZC-UNAM, mediante un estudio *in vitro* en cultivo celular. Como primer punto, se identificaron los receptores celulares por los que presentan afinidad los influenzavirus porcino; ácido siálico (SA) $\alpha 2,3$ y $\alpha 2,6$ mediante lectinas específicas *Maackia amurensis* y *Sambucus nigra* en las líneas celulares: A549 (adenocarcinoma pulmonar humano) y MDCK (riñón de perro); demostrando la presencia de SA- $\alpha 2,3$ y SA- $\alpha 2,6$ en la superficie celular de ambas líneas. En el segundo punto se evaluó la dinámica de infección en las dos líneas celulares de los influenzavirus porcinos *A/swine/Mexico/Ver37/2010 (H1N1)*, *A/swine/Mexico/Mex52/2010 (H1N1)*, *A/swine/Mexico/Mich40/2010 (H3N2)* y *A/swine/Mexico/Mex51/2010 (H3N2)* mediante la cuantificación de las copias virales por RT-PCR en tiempo real y el título hemaglutinante de los sobrenadantes de infección a las 24, 48 y 72 hpi así como la observación del efecto citopático. Las células A549 fueron susceptibles a la infección por virus porcinos. Los mayores títulos virales se obtuvieron en las células MDCK. Los influenzavirus mexicanos presentaron diferentes dinámicas de infección siendo *A/swine/Mexico/Mex51/2010(H3N2)* el más virulento.

CONTENIDO

DEDICATORIAS	ii
AGRADECIMIENTOS	iii
ABSTRACT	v
RESUMEN	vi
LISTA DE FIGURAS	3
LISTA DE ANEXOS	4
1. LA INFLUENZA.....	5
1.1. Influenza en salud pública.....	8
1.1.1. Influenza estacional.....	8
1.1.2. Influenza pandémica.....	8
1.2. Influenza en cerdos.....	8
2. LOS INFLUENZAVIRUS A.....	10
2.1. Biología de los Influenzavirus.....	10
2.1.1. La familia Orthomyxoviridae.....	10
2.1.2. Estructura y genoma.....	10
2.1.3. Ciclo de replicación.....	12
2.2. Clasificación y nomenclatura.....	14
2.1. Mecanismos de evolución: drift y shift.....	14
2.2. Determinantes de la infección.....	16
2.2.1. El receptor: ácido siálico.....	16
2.2.2. Especificidad del receptor.....	18
2.3. Transmisión interespecie.....	20
2.3.1. Pandemias en la historia.....	20
2.3.2. El cerdo como hospedero intermediario.....	21
3. ANTECEDENTES.....	24
5. OBJETIVOS.....	25
7. HIPÓTESIS.....	26
8. JUSTIFICACIÓN.....	27
10. MATERIAL Y MÉTODOS.....	28
10.1. Líneas celulares y virus de influenza porcina.....	28

10.1.1.	Líneas celulares MDCK y A549.	28
10.1.2.	Virus de influenza porcina mexicanos.	28
10.1.3.	Aislamiento viral en embrión de pollo.	28
10.2.	Identificación del ácido siálico en MDCK y A549.	29
10.3.	Infección viral en cultivo celular.	30
10.4.	Evaluación de la dinámica de infección.	31
11.	RESULTADOS.	32
11.1.	Expresión del ácido siálico α 2,3 y α 2,6 en MDCK y A549.....	32
11.2.	Dinámica de infección de los virus de influenza porcina en MDCK y A549.	33
12.	DISCUSIÓN.....	40
13.	CONCLUSIONES.....	46
	ANEXOS.....	47
	REFERENCIAS.....	52

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. SUBTIPIFICACIÓN DE LOS CASOS POSITIVOS A INFLUENZAVIRUS HUMANOS REGISTRADOS A NIVEL MUNDIAL DE 2009-2016 EN FLUNET (OMS).....	6
FIGURA 2. SITUACIÓN DE LOS INFLUENZAVIRUS PORCINOS REGISTRADOS EN EL GENBANK DE 2010-2015.	7
FIGURA 3. ESTRUCTURA DE LOS VIRIONES DEL INFLUENZAVIRUS TIPO A (IAV).	11
FIGURA 4. PROTEÍNAS DE LOS INFLUENZA A VIRUS Y SUS FUNCIONES.	12
FIGURA 5. ESQUEMA DE LA REPLICACIÓN DE LOS IAV.	13
FIGURA 6. ECOLOGÍA DE LOS INFLUENZA A VIRUS EN SUS DIFERENTES HOSPEDEROS.	15
FIGURA 7. MECANISMOS DE EVOLUCIÓN EN LOS INFLUENZAVIRUS: SHIFT Y DRIFT ANTIGÉNICO.	16
FIGURA 8. DIFERENTES CONFIGURACIONES DEL ÁCIDO SIÁLICO Y SU RELACIÓN CON LA AFINIDAD DE LOS INFLUENZAVIRUS.	17
FIGURA 9. AFINIDAD DE LAS LECTINAS MAA Y SNA.	18
FIGURA 10. ESPECIFICIDAD DE UNIÓN AL RECEPTOR.	19
FIGURA 11. DISTRIBUCIÓN DE LOS SA- α 2,3 Y SA- α 2,6 EN EL TRACTO RESPIRATORIO DE LOS CERDOS.	22
FIGURA 12. CARACTERÍSTICAS GENÉTICAS DEL A/H1N1 PANDÉMICO DEL AÑO 2009.	23
FIGURA 13. REPLICACIÓN DE VIRUS DE INFLUENZA EN EMBRIÓN DE POLLO.	29
FIGURA 14. PROCESO DE IDENTIFICACIÓN DE LOS RECEPTORES DE ÁCIDO SIÁLICO EN MDCK Y A549.	30
FIGURA 15. MICROGRAFÍAS DE MDCK TEÑIDAS CON MAAII Y SNA (20X).	32
FIGURA 16. MICROGRAFÍAS DE A549 TEÑIDAS CON MAAII Y SNA (20X).	33
FIGURA 17. VIABILIDAD CELULAR EN LA LÍNEA MDCK.	34
FIGURA 18. VIABILIDAD CELULAR EN LA LÍNEA A549.	35
FIGURA 19. RESULTADOS DE LA INFECCIÓN POR INFLUENZAVIRUS PORCINOS EN CÉLULAS MDCK Y A549.	36
FIGURA 20. DINÁMICA DE INFECCIÓN DE LOS INFLUENZAVIRUS PORCINOS MEXICANOS EN MDCK Y A549.	37
FIGURA 21. CUANTIFICACIÓN POR RT-PCR EN TIEMPO REAL EN LA INFECCIÓN VIRAL EN MDCK.	38
FIGURA 22. CUANTIFICACIÓN POR RT-PCR EN TIEMPO REAL EN LA INFECCIÓN VIRAL EN A549.	39

LISTA DE ANEXOS

ANEXO 1. FLUORESCENCIA EN LAS MICROGRAFÍAS DE MDCK Y A549.	47
ANEXO 2. FLUORESCENCIA POR CITOMETRÍA DE FLUJO EN MDCK Y A549.....	48
ANEXO 3. RESULTADOS DE LA RT-PCR DE LA INFECCIÓN VIRAL EN MDCK.	49
ANEXO 4. RESULTADOS DE LA RT-PCR DE LA INFECCIÓN VIRAL EN A549.....	50
ANEXO 5. MUTACIONES ASOCIADAS A LA HA DEL SUBTIPO A/H1N1.....	51

1. LA INFLUENZA.

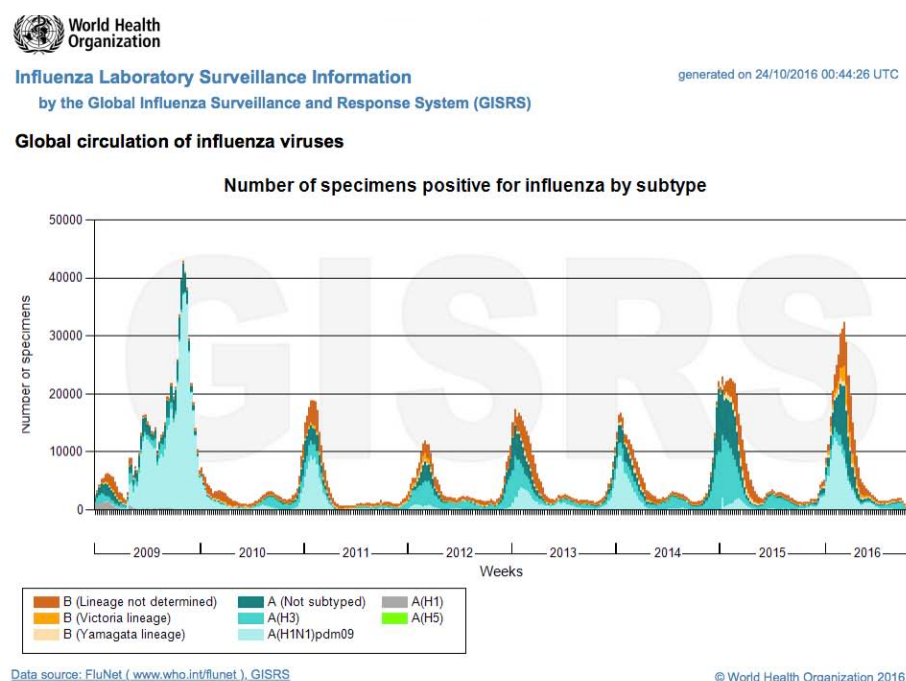
La influenza es una enfermedad respiratoria aguda de origen viral y distribución mundial que afecta a una amplia variedad de especies animales (1), incluidos los humanos; por lo cual se pueden presentar infecciones interespecie entrañando un potencial riesgo zoonótico. La morbilidad de esta enfermedad es elevada y la letalidad suele ser menor sin embargo ésta depende de la cepa viral así como de la situación fisiológica del hospedero.

Con la emergencia del H1N1 pandémico del año 2009 (H1N1pdm09) con genes de origen porcino y las infecciones esporádicas resultantes en humanos por el H5N1 aviar de alta patogenicidad (H5N1 HPAI) (2), en años recientes los virus de influenza de origen animal se han destacado como potenciales riesgos en la salud pública; razón por la cual la participación del sector en salud animal en colaboración con el de salud pública en la vigilancia y monitoreo de los influenzavirus se considera importante para mantener al mínimo el riesgo de transmisión entre humanos y animales. La ecología de los influenzavirus ejemplifica la necesidad y beneficios de aproximar su estudio mediante el enfoque de “una-salud” el cual involucra la interacción dinámica entre la salud animal, los factores ambientales y el sistema inmunológico del hospedero humano (3).

Existe una amplia variedad de influenzavirus que circulan entre diferentes especies de aves silvestres acuáticas que se les ha considerado como los reservorios naturales de la enfermedad ya que no presentan signología de la enfermedad (4). Los virus de alta patogenicidad tienen un impacto severo en salud animal: infecciones en humanos con H5N1 HPAI tienen consecuencias mortales (5); otros influenzavirus aviares de notificación aunque de baja patogenicidad, son un riesgo para la producción avícola; la influenza equina tiene un impacto significativo en el desempeño de los caballos; la influenza porcina por lo general es una enfermedad moderada en cerdos sin embargo representa un importante impacto económico.

La necesidad de implementar un sistema de vigilancia mundial con la finalidad de prevenir las consecuencias fatales que conlleva una pandemia de influenza (6), en la actualidad existen diversas plataformas electrónicas para el registro y monitoreo de los influenzavirus circulantes en humanos y otras especies animales; algunas de ellas están soportadas por importantes organismos internacionales tal es el caso de FLUNET de la Organización Mundial de la Salud (OMS) en donde se puede encontrar información sobre

los distintos influenzavirus que resultan de los casos en humanos que se registran en diferentes países alrededor del mundo (**Figura 1**); para los influenzavirus en animales se cuenta con OFFLUNET que corresponde a la colaboración entre la Organización Mundial de Sanidad Animal y la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (OIE-FAO) en esta plataforma se registran y clasifican los virus aislados en diferentes especies animales con especial interés en las especies domésticas y productivas (**Figura 2**). Lo interesante de estas plataformas es que se encuentran disponibles en línea y pueden ser consultadas por los diversos sectores en investigación médica, epidemiológica, veterinaria, etc.

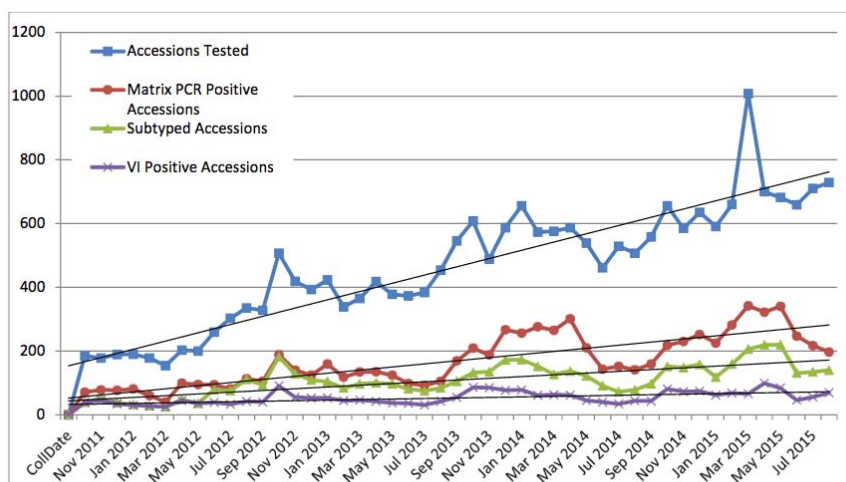


Fuente: WHO (2017). *FluNet - CHARTS*.

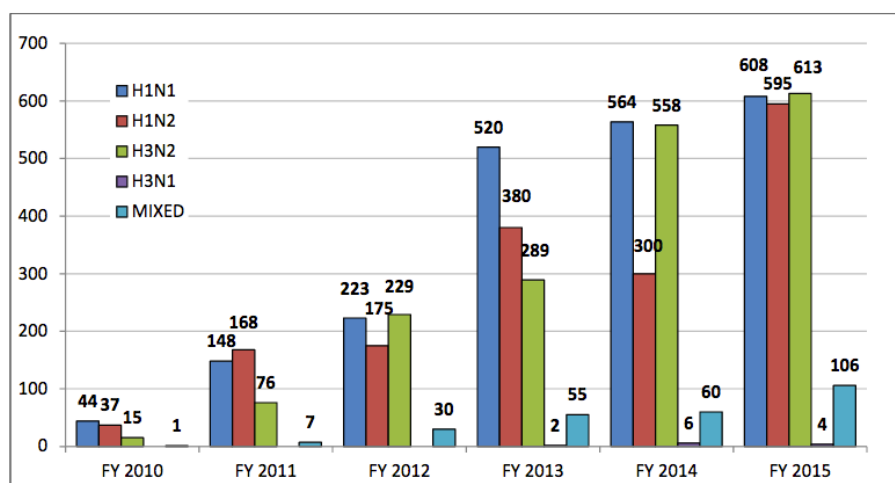
Figura 1. Subtipificación de los casos positivos a influenzavirus humanos registrados a nivel mundial de 2009-2016 en FLUNET (OMS).

Durante el año 2009, cuando surgió la pandemia de H1N1 triple rearrglante, se presentó el mayor número de muestras positivas para este subtipo, el cual se ha presentado con menor frecuencia en los años posteriores. A partir de 2011 hasta 2016 se observa un patrón estacional de presentación de la enfermedad que en el primer semestre del año aparece el mayor número de positivos para cualquier tipo de influenzavirus. De particular interés, se puede apreciar que un gran número de muestras positivas corresponden al tipo A sin embargo no están subtipificadas lo cual podría ser indicativo de la presencia de otros subtipos circulando en la población humana que no coincidan con los ya descritos hasta el momento.

A) Accesos de influenzavirus porcinos registrados en el GenBank de 2011-2015.



B) Número de registros de virus de influenza porcina según su subtipo de 2010-2015.



Fuente: OIE & FAO (2017). *OFFLU OIE/FAO Network of expertise on animal influenza*.

Figura 2. Situación de los influenzavirus porcinos registrados en el GenBank de 2010-2015.

(A) A partir de 2010 se presenta un incremento en el registro de accesos en el GenBank para influenzavirus porcinos (azul) los cuales han ido en aumento cada año. Dentro de estos accesos, una menor cantidad es positiva para el gen M por PCR (rojo) y menos de 200 accesos por año están subtipificados (verde). (B) Los subtipos H1N1 (azul) y H3N2 (rojo) han ido en aumento en sus registros de 2010-2015, mientras que el subtipo H1N2 (rojo) presenta variaciones en sus registros por año. El mayor número de registros para estos tres subtipos se presenta en el año 2015. El subtipo H3N1 (morado) que fue descrito en el año 2006 presenta el menor número de registros, mientras que los subtipos mixtos (azul claro) han ido en aumento aunque con menos registros que los principales subtipos.

1.1. Influenza en salud pública.

1.1.1. Influenza estacional.

La influenza estacional se presenta por brotes anuales que por lo general coinciden en el invierno (3), diseminándose de persona a persona mediante el contacto directo con aerosoles. Estos virus pueden provocar la enfermedad presentándose de moderada a grave, e incluso llegar hasta la muerte, dependiendo de la susceptibilidad de la persona así como de su estado inmunológico siendo por lo general una población más susceptible las mujeres embarazadas, ancianos y niños pequeños (9). Estos virus evolucionan de manera constante por lo cual las vacunas deben ser renovadas con regularidad (anual o bianual). La OMS estima que los casos anuales de influenza estacional exceden los 1,000 millones (15% de la población) mientras que las muertes van de las 300-500 mil. En los Estados Unidos de América (EUA) el costo económico anual en el tratamiento contra la influenza implica \$10.4 mil millones de dólares; cobrando 36 mil muertes al año y 200 mil casos en hospitalización (10). En México la información en morbilidad y mortalidad es limitada; sin embargo en un estimado del periodo de 2000-2008 se obtuvo un promedio de 19,200 muertes al año por influenza estacional (11).

1.1.2. Influenza pandémica.

Una pandemia de influenza ocurre cuando un virus que no circulaba previamente entre la población y contra el cual, en consecuencia, no existía inmunidad previa comienza a transmitirse de persona a persona (12) generando graves brotes de la enfermedad, independientes a los de la influenza estacional, y que además por la ausencia de inmunidad se puede presentar una alta tasa de mortalidad. Los influenzavirus evolucionan mediante diferentes mecanismos y fácilmente pueden atravesar las barreras interespecie, convirtiéndose en una vía para la emergencia de pandemias (13).

1.2. Influenza en cerdos.

La influenza porcina es una enfermedad endémica en las poblaciones de cerdos de América, Europa y Asia. Es una de las principales causas de neumonía viral en cerdos y

pertenece al complejo respiratorio porcino (14). Los brotes de la enfermedad se caracterizan por ser de alta morbilidad, hasta del 100%, y en la mayoría de las presentaciones existe una rápida resolución del cuadro clínico, siempre y cuando no se encuentren otros patógenos oportunistas la mortalidad es casi nula. Las pérdidas económicas resultan principalmente de la reducción en la ganancia diaria de peso de los animales lo cual se traduce en el retraso en el tiempo de salida al mercado (15).

Los subtipos endémicos en los cerdos son A/H1N1, A/H3N2 y A/H1N2, siendo el último un rearrreglo entre los dos primeros que a su vez, son compartidos con los virus que afectan a los humanos (16). Durante las últimas décadas nuevos influenzavirus rearrreglantes, que comparten uno o más genes con otro virus, han sido originados en los cerdos a partir de virus aviares, humanos o incluso porcinos, volviendo más compleja la epidemiología de la influenza porcina.

Durante las últimas décadas algunos virus porcinos han logrado transmitirse a los humanos y establecerse dentro de la población. Ocasionalmente se presentan infecciones directas entre humano-cerdo, sin lograr un establecimiento, y se asocian con un riesgo de tipo ocupacional principalmente en personas que tienen contacto directo con los cerdos infectados (17) tal es el caso de los trabajadores de granja y los médicos veterinarios.

2. LOS INFLUENZAVIRUS A.

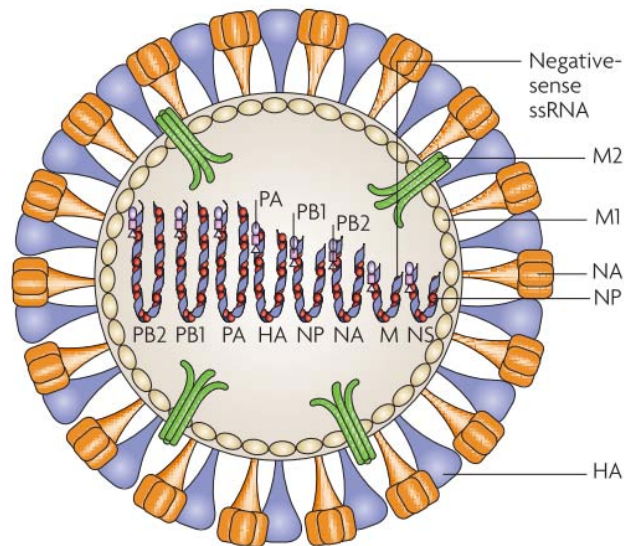
2.1. Biología de los Influenzavirus.

2.1.1. La familia *Orthomyxoviridae*.

La familia *Orthomyxoviridae* se compone por virus que presentan un genoma segmentado, de 6-8 segmentos, de ARN monocatenario con polaridad negativa y además poseen estructuralmente una envoltura lipídica que obtienen a partir de la membrana plasmática de la célula que infectaron (18). El Comité Internacional de Taxonomía Viral (19) reconoce 6 géneros dentro de los *Orthomyxovirus* que son los *Influenzavirus A*, *Influenzavirus B*, *Influenzavirus C*, *Thogotovirus*, *Isavirus* y *Quaranjavirus*. En el año 2014 se describió un nuevo género de *Influenzavirus* que se designó como tipo D (20), el cual ya ha sido aceptado por el ICTV. Las diferencias genéticas en la nucleoproteína (NP) y la proteína de matriz (M) son las que definen a los distintos géneros de *Influenzavirus* (21). Dentro de la familia *Orthomyxoviridae* son los *Influenzavirus A* (IAV) los que han sido más estudiados debido a que infectan a una amplia gama de hospederos aviares y mamíferos (humanos, cerdos, caballos, perros y mamíferos acuáticos) (4).

2.1.2. Estructura y genoma.

Los viriones de IAV presentan una morfología pleomórfica que por lo general se presenta de forma esférica con aproximadamente 100 nm de diámetro, sin embargo algunas variantes presentan formas filamentosas que pueden alcanzar los 300 nm. En la envoltura viral se proyectan las proteínas de superficie; la hemaglutinina (HA), la neuraminidasa (NA) y el canal iónico (M2) (**Figura 3**), siendo consideradas como las proteínas de membrana externa y por lo tanto son las estructuras que tienen el primer contacto con las células del hospedero. Por debajo de la envoltura, se encuentra la cápside que se conforma por un entramado de la proteína de matriz (M1) cuya principal función es brindar protección al genoma y evitar su degradación (18,22).



Fuente: Nelson & Holmes (2007). *Nature reviews. Genetics*, 8(3)

Figura 3. Estructura de los viriones del Influenzavirus tipo A (IAV).

Los viriones de los influenzavirus A (IAV) presentan por lo general una morfología esférica, son virus envueltos que en su superficie proyectan 3 proteínas membranales; la hemaglutinina (HA), la neuraminidasa (NA) y el canal iónico (M2). La cápside viral está formada por una red de proteínas de matriz (M1) que están dispuestas de manera icosaédrica alrededor del genoma viral. El genoma viral de los IAV consta de 8 segmentos de ARN monocatenario con polaridad negativa asociados al complejo de polimerasas (PB1, PB2 y PA) y rodeados por una serie de nucleoproteínas (NP) conformando en conjunto a las ribonucleoproteínas.

El ARN de los IAV tiene un tamaño total de 14 kb y se compone de 8 segmentos. Cada uno de los segmentos forma un complejo molecular llamado ribonucleoproteína (RNP). Las RNP consisten en un segmento de ARN unido al complejo de polimerasas; básicas PB1, PB2 y ácida PA, y rodeado por una serie de nucleoproteínas (NP) (21,24).

Cada uno de los segmentos dentro del genoma, codifica para al menos una proteína y típicamente se ha descrito la traducción de 11-12 proteínas, sin embargo en algunas variantes se han encontrado hasta 14-15 diferentes proteínas (25,26) (**Figura 4**).

Proteínas de los IAV y sus funciones

Segmento	Proteína codificada	Función
1 PB2	Polimerasa básica 2 (PB2)	Síntesis de ARN viral
2 PB1	Polimerasa básica 1 (PB1)	Síntesis de ARN viral
	PB1-F2	Actividad pro-apoptótica y antagonista del interferón
	PB1-N40	No determinada
3 PA	Polimerasa ácida (PA)	Síntesis de ARN viral
	PA-X	No determinada
	PA-N182	No determinada
	PA-N15	No determinada
4 HA	Hemaglutinina (HA)	Unión viral a los receptores celulares y fusión de las membranas virales y endosomales
5 NP	Nucleoproteína (NP)	Síntesis de ARN viral
6 NA	Neuraminidasa (NA)	Escisión del ácido siálico en la superficie celular, promoviendo la liberación de los viriones y evitando la agregación de partículas virales
7 M	Proteína de matriz (M1)	Exporte nuclear del complejo de ribonucleoproteínas
	Proteína del canal iónico (M2)	Canal iónico transmembranal que permite el paso de iones hidrógeno del endosoma a la partícula viral
8 NS	Proteína no estructural (NS1)	Antagonista de la respuesta inmune innata
	Proteína de exporte nuclear (NEP)	Exporte nuclear de las ribonucleoproteínas

Fuente: Adaptado de Munoz et al. 2015. *Genetic Adaptation of Influenza A Viruses in Domestic Animals and Their Potential Role in Interspecies Transmission: A Literature Review*. EcoHealth.

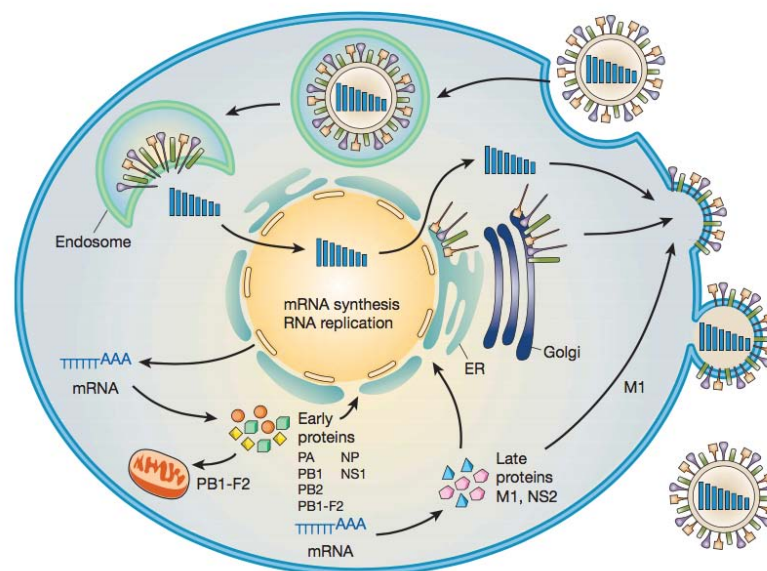
Figura 4. Proteínas de los Influenza A virus y sus funciones.

En la tabla se muestran a los 8 segmentos de ARN de los IAV y las proteínas para las cuales codifican cada uno de ellos, donde las proteínas estructurales corresponden a la hemaglutinina, neuraminidasa y proteína de matriz del canal iónico, mientras que el resto participan durante el ciclo replicativo viral.

2.1.3. Ciclo de replicación.

La endocitosis mediada por receptor es el principal mecanismo de entrada de los IAV a las células del hospedero, lo cual inicia con la unión de la hemaglutinina (HA) viral al receptor (ácido siálico principalmente) en la membrana plasmática (27). Al ser internalizado el virión, se conforma un endosoma con la membrana plasmática invaginada. El endosoma se acidifica lo cual permite cambios conformacionales en la HA permitiéndole exponer el péptido de fusión. Este péptido fusiona la membrana del endosoma con la del

virión lo cual favorece la interacción de las RNP virales con el citoplasma. De forma paralela mediante el canal iónico M2 ingresan iones hidrógeno (H^+) que tornan más ácido el interior del virión y permite la liberación del genoma viral de la proteína de matriz (M1) (28). Ya libres las RNP virales se exportan al núcleo mediante el complejo del poro. Una vez dentro del núcleo el RNA es transcrito en RNA mensajero (mRNA) que es exportado al citoplasma para ser traducido a las proteínas de los IAV en los ribosomas. Algunas de las proteínas traducidas se exportan a la membrana (HA, NA y M2) y otras regresan al núcleo para promover la transcripción y replicación de las RNP virales que conformaran los nuevos viriones progenie (24). Las RNP progenie se exportan al citoplasma con la asistencia de M1 y proteínas de exporte nuclear (NEP). Estas RNP virales se transportan a través de vesículas RAB11 y son incorporadas a los viriones progenie que ya contienen HA, NA, M2 y M1. (Figura 5)



Fuente: Neumann, G. et al (2009). *Nature*, 459(7249), 931–939.

Figura 5. Esquema de la replicación de los IAV.

La endocitosis de los viriones de IAV está mediada por receptores presentes en la membrana plasmática celular. El endosoma libera las ribonucleoproteínas y estas son exportadas al núcleo en donde la transcripción y la replicación se llevan a cabo. Los RNA mensajeros (mRNA) son traducidos en el citoplasma y las proteínas tempranas requeridas para la continuar con replicación y transcripción regresan al núcleo, mientras que las proteínas estructurales migran a la membrana plasmática para el ensamblaje de los viriones de la progenie.

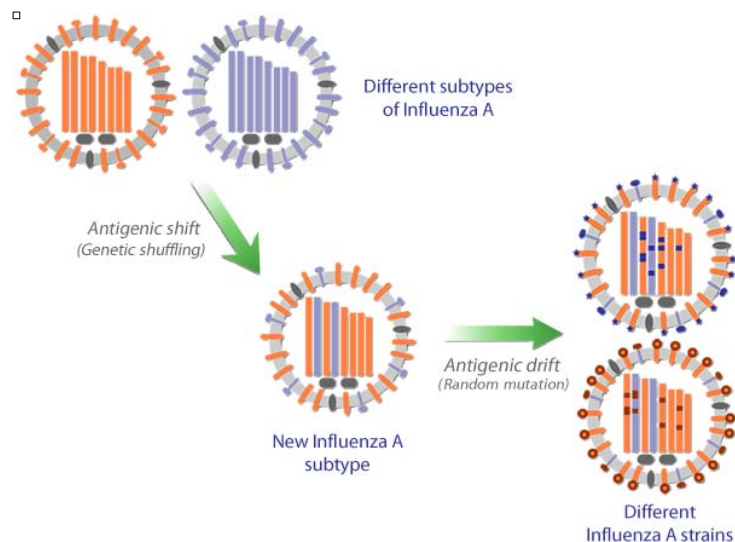
2.2. Clasificación y nomenclatura.

Las características antigénicas de la HA y la NA son bases para clasificar en diferentes subtipos a los IAV, asignando un número de HA y NA respectivamente (H1N1, H3N2, entre otros). Hasta la fecha se conocen 18-HA, que van del H1-H18, así como 11-NA, del N1-N11, donde la mayoría de las diversas combinaciones posibles entre ellas se han encontrado en aves silvestres acuáticas principalmente de los géneros *Anseriformes* y *Charadriiforme* razón por la cual se les ha propuesto como reservorios naturales de los IAV (29,30); excepto para los subtipos H17N10 y H18N10 que únicamente han sido aislados a partir de las especies de murciélagos *Sturnira lilium* y *Artibeus planirostris* que habitan en el centro y sur del continente americano (31,32) (**Figura 6**).

Las cepas de los IAV son nombradas según el género (tipo A, B, C o D), la especie de la cual se aisló (si es de humano se omite), el número del aislamiento, el lugar donde se aisló, año del aislamiento y subtipo (18). Un ejemplo para esta nomenclatura es A/California/04/2009(H1N1), el cual pertenece a un tipo A aislado en California en el año 2009 con un subtipo H1N1.

2.1. Mecanismos de evolución: drift y shift.

Los IAV evolucionan continuamente debido a que están constantemente sometidos a una presión selectiva de sus variantes con la finalidad de evadir la respuesta inmune del hospedero, lo cual en consecuencia resulta en cambios genéticos adquiridos en su mayoría por mutaciones puntuales asociadas principalmente a los errores en la ARN polimerasa, la cual no posee la capacidad correctiva de la ADN polimerasa, y por otro lado al intercambio de segmentos entre distintos IAV pertenezcan o no al mismo subtipo (33). Estos dos mecanismos que permiten los cambios genéticos dentro de los IAV se conocen como deriva antigénica (*drift*) y rearreglo genético (*shift*) (**Figura 7**), y se han descrito como los más importantes para la evolución de los IAV ya que tienen en consecuencia la generación de virus diferentes a los parentales.



Fuente: WHO (2017). WHO Collaborating Centre for Reference and Research on Influenza (VIDRL). <http://www.influenzacentre.org/>

Figura 7. Mecanismos de evolución en los influenzavirus: *shift* y *drift* antigénico.

En la imagen se describe la interacción entre dos diferentes subtipos de influenzavirus (naranja y morado). El shift antigénico sucede cuando existe un intercambio de genes entre los dos subtipos, representado por los dos segmentos morados dentro del genoma del virus naranja en donde uno de los genes codifica para una proteína de superficie lo cual modifica de manera radical su antigenicidad dando origen a un nuevo subtipo de influenzavirus. En el drift antigénico tomando como base al nuevo subtipo generado, se presentan algunas mutaciones puntuales en algunos genes, las cuales modifican su comportamiento antigénico de manera tal que permita la evasión de la respuesta inmune, lo cual da origen a diferentes cepas virales del mismo subtipo.

2.2. Determinantes de la infección.

2.2.1. El receptor: ácido siálico.

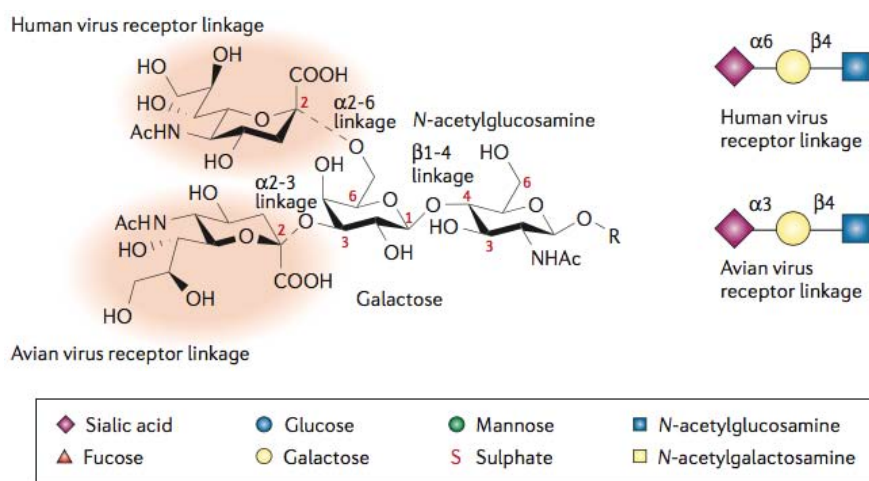
En 1941 Hirst observó que los IAV tienen la capacidad de aglutinar eritrocitos de ave (40) y años después en 1957 Gottschalk inhibió la aglutinación de los IAV al utilizar la sialidasa derivada de *Vibrio cholerae* (41), proponiendo así la presencia de un receptor específico para estos virus describiéndose así por primera vez al ácido siálico como dicho receptor. Posteriores ensayos con eritrocitos e IAV con origen de diferentes especies fueron realizados obteniendo respuestas variables en su unión.

El ácido siálico (SA) es una molécula con polaridad negativa que abunda en la superficie celular y corresponde a un monosacárido de 9 carbonos. Los SA más comunes son el ácido N-acetilneuramínico y el ácido N-glicolilneuramínico, mismos que son ubicuos en la mayoría de los vertebrados (42). En el carbono 2 (C2) los SA presentan enlaces alfa (α) con

las cadenas de carbohidratos de algunas estructuras glicosiladas, siendo los más comunes en humanos los enlaces SA- α 2,3, SA- α 2,6 y SA- α 2,6 unidos a una galactosa (43,44) .

Los SA tienen un papel importante en la estabilización de moléculas y membranas, pueden proteger a la célula de la actividad de proteasas o glicosidasas extendiendo su vida y función (42). Al poseer polaridad negativa, están involucrados en la unión y transporte de moléculas con polaridad positiva; participando también en los fenómenos de unión, atracción y repulsión entre moléculas así como en la modulación de procesos de señalización transmembranal, crecimiento y diferenciación celular (42,43) (**Figura 8**).

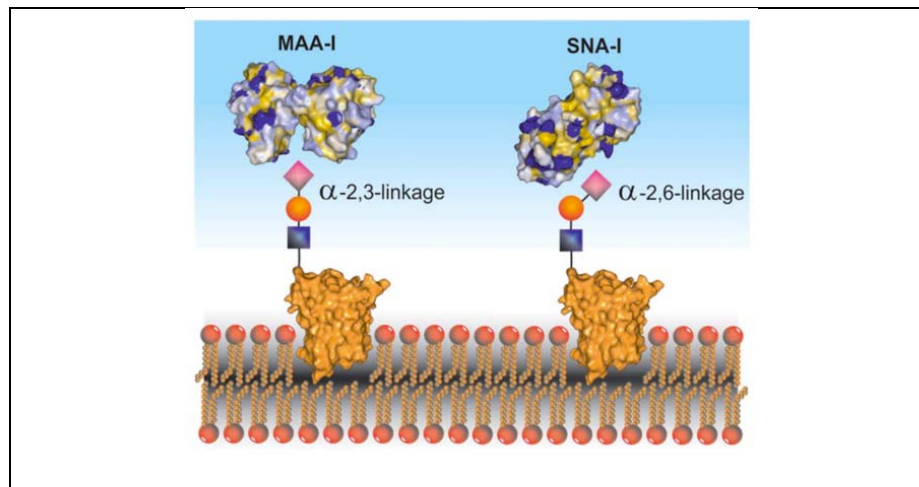
Los SA pueden servir como ligandos de una amplia variedad de lectinas animales y microbianas (43). Estas lectinas son estructuras proteicas que presentan afinidad por los glicanos, en este caso se unen a los carbohidratos del ácido siálico de manera específica e incluso pueden diferenciar entre sus distintas conformaciones. Las lectinas de origen vegetal *Maackia amurensis* (MAA) y *Sambucus nigra* (SNA) reconocen los SA- α 2,3 y los SA- α 2,6 respectivamente (45) por lo cual han sido utilizadas en la identificación del tropismo por diversos influenzavirus aviares y de origen humano, en distintos tejidos y células (**Figura 9**).



Fuente: Stevens *et al.* (2006). *Nature Reviews Microbiology*. 4, 857-864

Figura 8. Diferentes configuraciones del ácido siálico y su relación con la afinidad de los influenzavirus.

En la imagen se muestran las dos posibles posiciones de la unión del ácido siálico a la galactosa α 2,3 y α 2,6 que son cruciales para el reconocimiento de la hemaglutinina de los influenzavirus aviares y humanos. Las regiones sombreadas de color rojo representan al ácido siálico a partir de su unión en el carbono 2 a la galactosa.



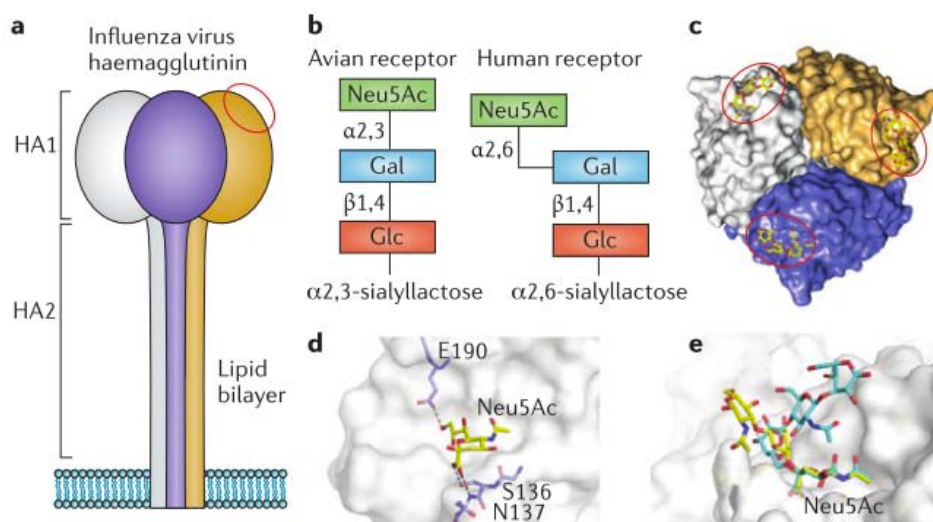
Fuente: Kluková, L., *et al* (2014). *Analytical Methods : Advancing Methods and Applications*, 6(14), 4922–4931.

Figura 9. Afinidad de las lectinas MAA y SNA.

Las lectinas son capaces de detectar pequeños cambios en la composición de los glicanos, de tal manera que *Maackia amurensis agglutinin* (MAA-I) es específica para reconocer a los ácidos siálicos de conformación α -2,3-mientras que *Sambucus nigra agglutinin* (SNA-I) lo hace para el ácido siálico α -2,6.

2.2.2. Especificidad del receptor.

En 1981 Wilson *et al.* cristalizaron la estructura de la HA de los IAV (46) y la describieron como un trímero que en el extremo de cada monómero presenta un sitio de reconocimiento al ácido siálico, flanqueado por la hélice-190, los bucles-130 y -220, y cuanta con algunos aminoácidos conservados en la mayoría de todos los virus de este género; Tyr-98, Trp-153, His-183 y Tyr-195 que conforman la base del sitio de unión al receptor (RBS por sus siglas en inglés) (**Figura 10**).



Fuente: Stencel-Baerenwald, *et al.* (2014). *Nature Reviews. Microbiology*, 12(11), 739–749.

Figura 10. Especificidad de unión al receptor.

a) Los 3 monómeros que componen a la hemagglutina viral se distinguen en color morado, gris y amarillo, señalando la parte más lejana a la bicapa lipídica (HA1) la cual se conoce como cabeza globular y donde se ubica el sitio de unión al receptor destacado con un círculo rojo. El resto del trímero se conoce como tallo (HA2) y es la parte más cercana a la bicapa lipídica. b) Las conformaciones del ácido siálico con afinidad para influenzavirus aviares y humanos de distinguen como $\alpha 2,3$ y $\alpha 2,6$. c) Una vista de la superficie de la cabeza globular del trímero de hemagglutina identifica los sitios de unión al receptor en cada uno de los monómeros. d) En un acercamiento a la HA1 se identifica al sitio de unión al receptor en color amarillo. e) En otro acercamiento a la HA1 de superponen los ácidos siálicos $\alpha 2,3$ y $\alpha 2,6$ en el sitio de unión al receptor representando la interacción de la célula blanco con la hemagglutina viral.

Los IAV aviares presentan afinidad por los SA- $\alpha 2,3$ y los de origen humano la tienen para los SA- $\alpha 2,6$, mientras que los porcinos pueden unirse tanto a SA- $\alpha 2,3$ como a SA- $\alpha 2,6$ (47–50). En los seres humanos el SA- $\alpha 2,6$ es más abundante en las vías respiratorias altas mientras que en el epitelio bronquial lo es el SA- $\alpha 2,3$ (51). Por otro lado, los cerdos expresan el SA- $\alpha 2,3$ y el SA- $\alpha 2,6$ distribuidos de manera homogénea a lo largo del tracto respiratorio (52). Las aves también expresan en mayor proporción al SA- $\alpha 2,3$ en las células del epitelio respiratorio e intestinal y en menor proporción lo hacen para el SA- $\alpha 2,6$ aunque existe una variación en las concentraciones de los SA para diferentes especies aviares domésticas y silvestres (53). Los eritrocitos de aves domésticas, principalmente *Gallus gallus*, son utilizados para los ensayos de aglutinación con IAV ya que expresan ambos SA- $\alpha 2,3$ y SA- $\alpha 2,6$; sin embargo carecen de N-glicanos los cuales son abundantes en el tracto respiratorio humano sesgando a veces la detección de algunos IAV de origen humano

cuando se emplean estas células. Por lo anterior, a partir de la pandemia de 2009 los hurones *Mustela putorius* fueron utilizados como modelo de estudio para la infección y diseminación de los IAV humanos, debido a que la distribución de los SA- α 2,3 y SA- α 2,6 en el tracto respiratorio de estos animales se asemeja a la que se presenta en los humanos (54).

La adaptación que se presenta tras la transmisión inter-especie de virus aviáres a los hospederos mamíferos, es decir, que modifican su afinidad por los SA- α 2,3 a los SA- α 2,6 se encuentra asociada con las mutaciones Gln-226-Leu y Gly-228-Ser al menos en las HA-H2 y H3 (55).

2.3. Transmisión interespecie.

2.3.1. Pandemias en la historia.

Dentro de la historia de la era moderna se consideran cuatro eventos pandémicos relevantes debido a la elevada morbilidad y mortalidad que causaron tras su presentación.

El primero de ellos corresponde a la “Gripe Española” de 1918 que fue causada por el A/H1N1 y se cree que tuvo su origen a partir de un virus aviar que circuló desde 1910. Históricamente se le ha considerado como la pandemia más letal de la época contemporánea, donde se registraron alrededor de 50 millones de muertes en todo el mundo (56).

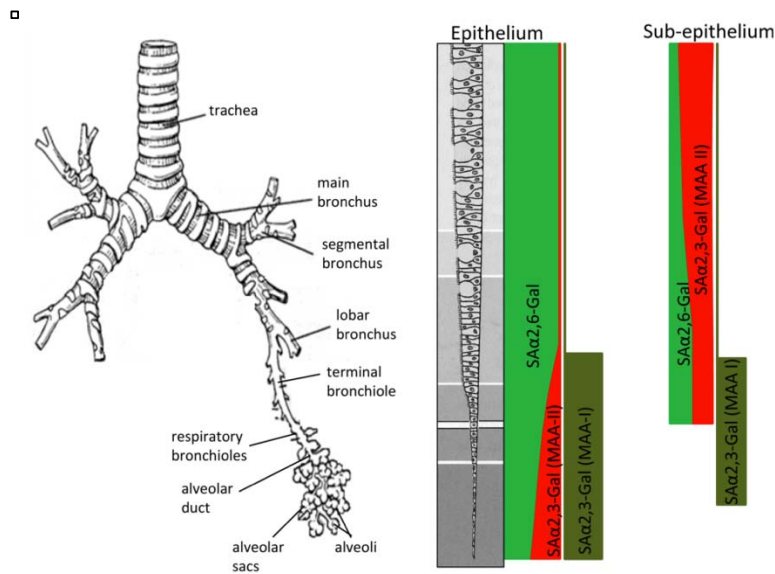
El segundo evento pandémico surge en Asia con el A/H2N2 de 1957 que cobró cerca de 2 millones de muertes. Este virus se originó a partir del rearreglo entre las HA, NA y PB1 de un A/H2N2 aviar y los restantes segmentos del H1N1 circulante en humanos (57) lo cual evidenció el potencial zoonótico de esta enfermedad.

En 1968 tiene lugar el tercer evento que también se sucedió en Asia, exactamente en Hong Kong con un subtipo A/H3N2, el cual hasta la fecha se mantiene en circulación dentro de la población humana, y ocasionó la muerte de al menos 1 millón de personas. Dentro de los principales cambios genéticos que este virus presentó con respecto del anterior, fue la introducción de la HA y la PB1 de un subtipo H3 aviar (57) y de esta manera el H3N2 sustituyó completamente al H2N2 de 1957.

Fue hasta el año 2009 cuando un A/H1N1 se detectó en México y se diseminó a diversas partes del mundo. La mortalidad por este virus fue considerada relativamente baja, sin embargo en la población juvenil si alcanzó una tasa elevada, contrario a lo presentado en personas mayores de 65 años quienes se ha propuesto que posiblemente contaban con una inmunidad protectora contra el A/H1N1 que circuló antes del año 1957 (58). En este caso los principales cambios genéticos presentados fueron la NA y M proveniente del IAV porcino euroasiático; mientras que algunos otros genes pertenecen al IAV porcino “triple rearreglante” originado a partir de intercambios entre genes de los virus humanos, aviares y de influenza porcina clásica (59).

2.3.2. El cerdo como hospedero intermediario.

Como se describió con anterioridad, los cerdos pueden ser susceptibles a la infección por IAV de origen aviar o humano debido a que presentan SA- α 2,3 y SA- α 2,6 (**Figura 11**). En 1994, *Kida et al.* infectaron cerdos con diferentes subtipos desde el H1 al H13 de origen aviar y lograron detectar la replicación de los mismos en los animales infectados (60). Diversos IAV aviares han sido aislados a partir de muestras de cerdos, ya sea que fueron infectados de manera experimental o en algunos otros casos de manera natural. Desde 1970, Kundin (61) confirmó un caso de A/H3N2 de origen humano infectando cerdos de Taiwan. Actualmente siguen presentándose infecciones antropozoonóticas por este mismo subtipo.



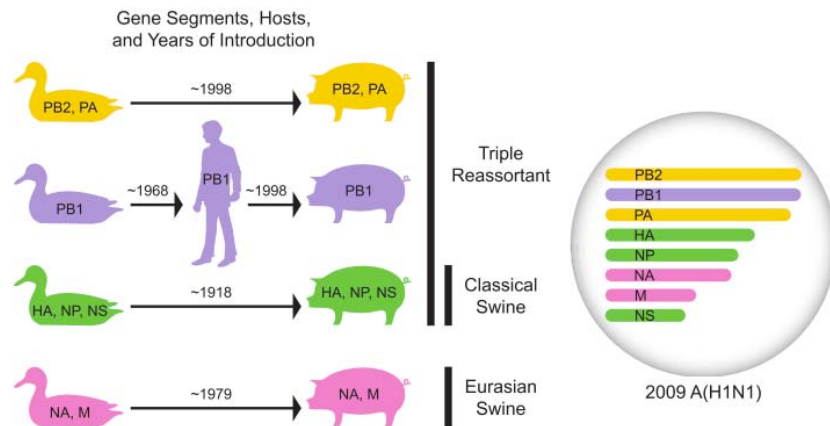
Fuente: Nelli *et al.* (2010). *BMC Veterinary Research*, 6(4)

Figura 11. Distribución de los SA- α 2,3 y SA- α 2,6 en el tracto respiratorio de los cerdos.

En la imagen se muestra el tracto respiratorio porcino desde la traquea hasta los sacos alveolares (derecha) y la proporción de SA- α 2,3 (verde) y SA- α 2,6 (rojo) identificado en el epitelio y subepitelio respiratorio. En el epitelio se puede observar que a lo largo de todo el tracto se expresa una mayor proporción de SA- α 2,6 y que la proporción de SA- α 2,3 se presenta a partir de las células bronquiales. Mientras que en el subepitelio las proporciones entre ambos receptores se dispone de manera homogénea.

En cerdos circulan de manera endémica tres subtipos virales: H1N1, H3N2 y H1N2; siendo los dos primeros compartidos con los humanos. En 1931, Shope aisló el primer IAV porcino después de que una enfermedad similar a la Gripe Española fuera descrita en los cerdos (62), por lo tanto algunos autores han propuesto que el A/H1N1 endémico en la población porcina se haya originado a partir del A/H1N1 pandémico de 1918, demostrando así la participación de los virus humanos dentro de la ecología de los influenzavirus porcinos. Este virus A/H1N1 se mantuvo endémico en las poblaciones porcinas y hasta la fecha se le conoce como virus de la influenza porcina clásica. En 1998, después de 80 años en los cuales el virus de la influenza porcina clásica se mantuvo genéticamente estable, comienza a circular el virus triple rearreglante A/H3N2 en cuyo genoma se encuentran segmentos del A/H1N1 clásico (NP, M, NS), del A/H3N2 de la influenza estacional en humanos (PB1, HA, NA) y de los IAV aviáres (PB2, PA) (63). El establecimiento del A/H3N2 y la coinfección con los virus previamente circulantes A/H1N1, generaron nuevos rearreglantes A/H1N1 y A/H1N2 (64) que esporádicamente reportaron infecciones en

humanos. Fue tras la pandemia de 2009 donde el papel del cerdo cobró gran relevancia debido a que surgió un virus que pudo transmitirse de humano a humano y cuyo origen fue a partir de varios segmentos de IAV porcinos (PB2, PB1, PA, NP y NS del A/H3N2 triple rearreglante porcino; HA de la influenza porcina clásica H1N1; y, NA y MP del A/H1N1 porcino euroasiático) (59,65) (**Figura 12**).



Fuente: Garten et al. (2009).. *Science*, 325.

Figura 12. Características genéticas del A/H1N1 pandémico del año 2009.

El A/H1N1 pandémico del año 2009 que surgió en los cerdos presenta en su genoma segmentos aviáres, humanos y porcinos. Los genes HA, NP y NS se conservan del virus de influenza porcina clásica (verde). Los genes NA y M provienen de un virus porcino euroasiático (rosa), mientras que el complejo de polimerasas lo hacen del virus triple rearreglante (amarillo) donde la PB1 (morado) se adaptó del humano a los cerdos.

3. ANTECEDENTES.

Después de la pandemia de 2009 en el Departamento de Medicina y Zootecnia de Cerdos (DMZC), Ávalos aisló diferentes virus de influenza porcina (SIV) de los subtipos H1N1 y H3N2 a partir de órganos provenientes de diversas unidades de producción porcina de México (66). En un trabajo posterior, Carrera realizó la secuenciación del genoma completo de dichos virus obteniendo genes de origen aviar y/o humano además del porcino (67).

Shinya *et al.* observaron una proporción mayor de SA- α 2,6 en células traqueales y bronquiales de origen humano diferenciadas *in vitro* (68) mientras que en diferentes muestras de tejido respiratorio Nicholls *et al.* encontraron SA- α 2,6 y SA- α 2,3 en el epitelio ciliado, células caliciformes y glándulas de la submucosa en bronquios así como en neumocitos alveolares, además de SA- α 2,3 en tejido metaplásico todo esto en tejidos humanos (51).

Las células epiteliales de adenocarcinoma pulmonar humano A549 permiten la replicación de virus de influenza humanos (69) y han sido utilizadas como un modelo humano para el estudio *in vitro* de la interacción virus-hospedero monitoreando los cambios celulares y moleculares durante la infección por influenzavirus (70).

Los influenzavirus rearreglantes poseen la capacidad de generar infecciones interespecie y en algunos casos se adaptan al hospedero volviéndose endémicos. En este trabajo se pretende determinar si los influenzavirus porcinos pueden infectar células humanas mediante la identificación de los receptores celulares requeridos.

5. OBJETIVOS.

- Identificar la presencia de los receptores SA- α 2,6 y SA- α 2,3 en las líneas celulares MDCK y A549.
- Identificar si los virus porcinos infectan las células de origen humano de la línea A549.
- Obtener la dinámica de infección *in vitro* de los virus de influenza porcina mexicanos en las dos líneas celulares.

7. HIPÓTESIS.

Las líneas celulares MDCK y A549 expresarán proporciones variables de los receptores SA $\alpha 2,3$ y $\alpha 2,6$ lo cual determinará su susceptibilidad a la infección con los influenzavirus porcinos mexicanos, estos influenzavirus presentarán niveles variables de replicación en ambas líneas celulares.

8. JUSTIFICACIÓN.

La pandemia de influenza del año 2009 fue generada por un virus triple rearreglante que se originó en el cerdo, por tal motivo es necesario conocer si los virus porcinos aislados y secuenciados en el DMZC tienen la capacidad de unirse a receptores sialil $\alpha 2,3$ y $\alpha 2,6$ que sugiera la posibilidad de infectar células humanas.

10. MATERIAL Y MÉTODOS.

10.1. Líneas celulares y virus de influenza porcina.

10.1.1. Líneas celulares MDCK y A549.

Las líneas celulares que se emplearon para identificar la presencia del ácido siálico y para realizar la infección con los influenzavirus porcinos fueron las MDCK de riñón de perro (ATCC, CRL-2936) y las A549 de adenocarcinoma pulmonar humano (ATCC, CCL-185). Ambas líneas fueron cultivadas en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, Sigma Aldrich), enriquecido con 10% de suero fetal bovino inactivado (SFB, Gibco) y mantenidas a 37°C en botellas de cultivo celular de 25 y 75 cm². Para realizar los pasajes celulares cuando la confluencia del monoestrato alcanzaba el 100% se utilizó tripsina-EDTA al 0.25% (ATCC).

10.1.2. Virus de influenza porcina mexicanos.

Los virus utilizados corresponden a los aislados por Ávalos (66) y disponibles en la viroteca del DMZC. Las secuencias del genoma completo de cada uno de los influenzavirus utilizados se encuentran disponibles para su consulta en el GenBank. Los virus que fueron utilizados y su número de acceso para el segmento 4 (HA) en el GenBank son: *A/swine/Mexico/Ver37/2010 (H1N1)* [CY122404]; *A/swine/Mexico/Mex52/2010 (H1N1)* [CY122357]; *A/swine/Mexico/Mich40/2010 (H3N2)* [CY122365]; y, *A/swine/Mexico/Mex51/2010 (H3N2)* [CY122349].

10.1.3. Aislamiento viral en embrión de pollo.

Para obtener volúmenes suficientes de virus para realizar los ensayos de infección, se realizó el aislamiento en embriones de pollo (EP) libres de patógenos específicos (SPF, ALPES I) de 9-11 días de edad. Se inocularon 0.2 ml de virus en la cavidad alantoidea y se incubaron a 37° C (**Figura 13**), recuperando el líquido alantoideo entre las 48-72 horas post-infección (hpi). Los aislamientos se titularon mediante hemoaglutinación, realizando diluciones dobles seriadas con solución saturada de fosfatos (PBS) y suspensión de

eritrocitos de ave (*Gallus gallus*) al 0.5%. El título viral corresponde a la última dilución donde macroscópicamente se observa hemoaglutinación y se expresa como unidades hemoaglutinantes (UHA).

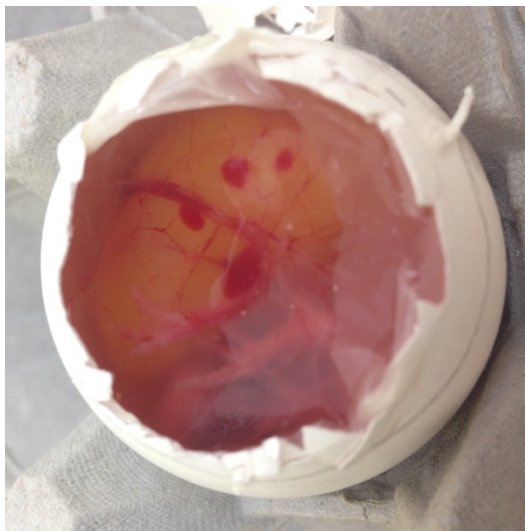


Figura 13. Replicación de virus de influenza en embrión de pollo.

En la imagen se observa la actividad hemoaglutinante que la replicación de los influenzavirus ocasiona en los eritrocitos del embrión de pollo.

10.2. Identificación del ácido siálico en MDCK y A549.

La metodología para la identificación del ácido siálico se realizó en colaboración con el alumno de doctorado del mismo programa Onasis Vicente Fermín.

En placas de cultivo celular de 96 pozos se sembraron 1×10^3 células/ml y a las 48 horas se fijaron con metanol absoluto. El bloqueo se realizó con albúmina sérica bovina libre de IgG (ASB, Sigma Aldrich) al 2% por 20 minutos a temperatura ambiente y las lectinas utilizadas fueron *Maackia amurensis agglutinin* biotinilada (MAAII, dilución 1:100, Vectorlabs) y *Sambucus nigra agglutinin* conjugada a isotiocionato de fluoresceína (SNA-FITC, dilución 1:200, Vectorlabs), diluidas en ASB al 1%. La reacción se incubó en oscuridad por 5 horas a 4°C en cámara húmeda. Se añadió estreptavidina-fluoresceína (FITC, dilución 1:100, Vectorlabs) a los pozos tratados con MAAII biotinilada y se incubó durante 1 hora más, bajo las mismas condiciones (**Figura 14**). Todos los pozos se lavaron con agua destilada y se agregó diamino fenilindol (DAPI, Sigma Aldrich) para teñir el

material genético celular. Las tinciones se realizaron por triplicado y se incluyeron células sin teñir como controles negativos.

Para remover el ácido siálico de la superficie celular, los pozos utilizados como control de sialidasa se trataron con neuraminidasa tipo V de *Clostridium perfringens* (Neu, 5U/ml, Sigma Aldrich) posterior a la fijación con metanol y se incubó durante una noche previa a la tinción. La edición de las fotografías se realizó con Image J y para la comparación de intensidades de fluorescencia se realizó una comparación entre grupos mediante la prueba de Tukey.

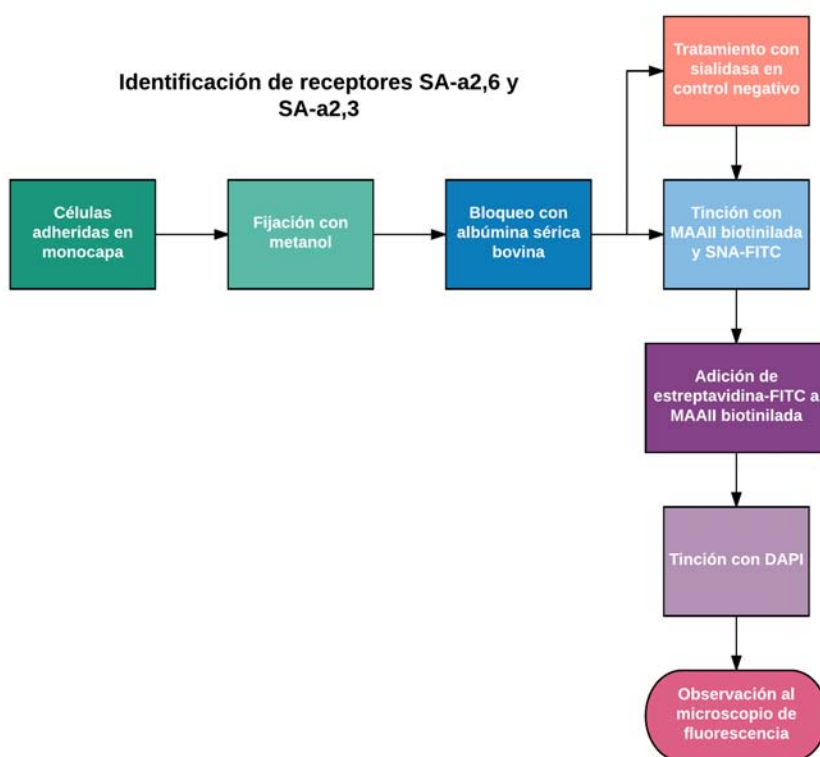


Figura 14. Proceso de identificación de los receptores de ácido siálico en MDCK y A549.

10.3. Infección viral en cultivo celular.

La infección viral se realizó agregando 0.2 ml de la suspensión viral (1:128 UHA) al monoestrato celular confluyente (>80%) de placas de 12 pozos, previamente preparadas con 1×10^6 células/ml, incubando por 30 minutos a 37°C. Transcurrido este tiempo se lavaron los pozos con PBS y se aspiró completamente el sobrenadante. Finalmente se agregó 1 ml

de DMEM 2% SFB y se incubó a 37° C por 72 horas, se colectaron los sobrenadantes cada 24 h y se mantuvieron en congelación (-70°C). Las infecciones se realizaron por duplicado y se incluyeron controles del cultivo celular sin infectar.

10.4. Evaluación de la dinámica de infección.

Las células infectadas fueron evaluadas a las 24, 48 y 72 hpi mediante la observación directa al microscopio del efecto citopático (ECP). Los sobrenadantes del cultivo celular colectados a las 24, 48 y 72 hpi fueron descongelados y centrifugados a 3500 rpm durante 5 minutos. La extracción de ARN viral y consecuente reacción de RT-PCR en tiempo real de los sobrenadantes se realizó con un kit comercial de columnas de sílica (QiaAMP, Qiagen). La RT-PCR cuantitativa en tiempo real se realizó con el kit VetMAX Gold AIV (Life Technologies) dirigido para la detección del gen M y para realizar la cuantificación de copias virales por microlítro de reacción se utilizó una curva estándar de cuatro diluciones décuples ($10^{8.4}$, $10^{7.4}$, $10^{6.4}$, $10^{5.4}$) de un ADN conocido (Biotecmol). La RT-PCR se llevó a cabo en el termociclador Corbett Rotor Gene (Qiagen) con las siguientes condiciones: 1) Transcripción reversa 48° C, 10 min; 2) Desnaturalización 95° C, 10 min; 3) Amplificación 40 ciclos 95° C, 15 seg y 60° C, 45 seg. El número de copias virales se expresó de manera exponencial con un logaritmo base 10. La titulación por hemoaglutinación de los sobrenadantes se realizó como se describió para la titulación del aislamiento en EP.

11. RESULTADOS.

11.1. Expresión del ácido siálico $\alpha 2,3$ y $\alpha 2,6$ en MDCK y A549.

Las células MDCK, consideradas como la línea de elección para el aislamiento de distintos influenzavirus, y las células A549 que en este trabajo corresponden al modelo de infección en humanos, fueron teñidas con las lectinas MAAII y SNA, ambas acopladas al fluorocromo FITC. La emisión de fluorescencia se observó directamente al microscopio, tanto para MAAII como para SNA en MDCK (**Figura 15**) y A549 (**Figura 16**), lo cual confirmó la expresión de los SA- $\alpha 2,3$ y SA- $\alpha 2,6$ en la superficie celular de ambas líneas; mientras que los pozos que no fueron teñidos con las lectinas sólo presentaron fluorescencia para DAPI. El tratamiento con la neuraminidasa (Neu), disminuyó la intensidad de fluorescencia para ambos tipos de ácido siálico en las dos líneas celulares.

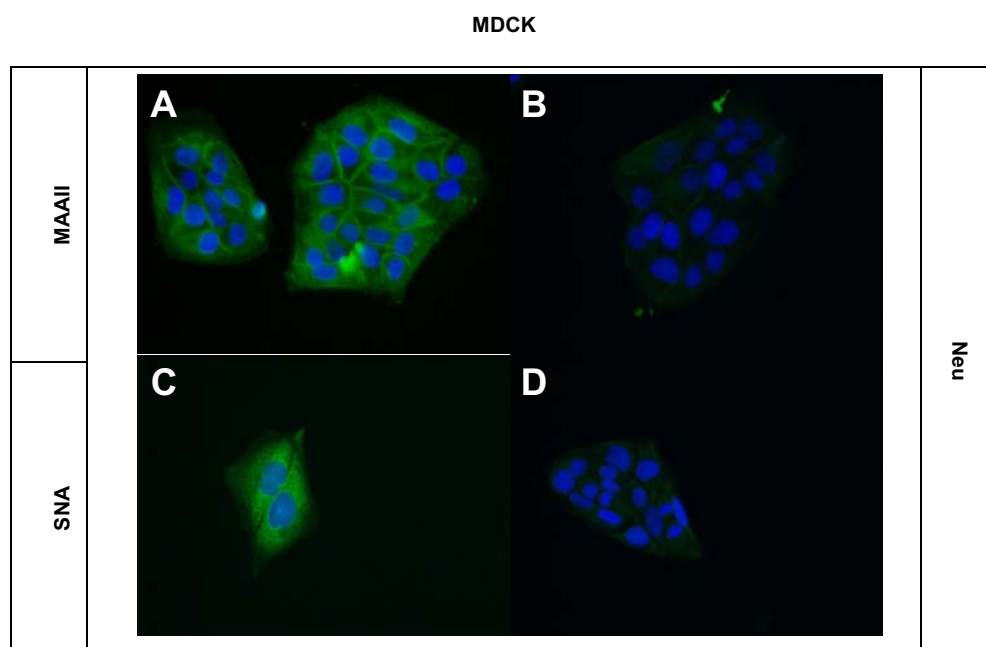


Figura 15. Micrografías de MDCK teñidas con MAAII y SNA (20X).

La expresión de los receptores SA- $\alpha 2,3$ en la línea MDCK se evidenció mediante la tinción con la lectina MAAII (A) que al ser tratada con neuraminidasa disminuyó su expresión (B). Los receptores SA- $\alpha 2,6$ también se encontraron expresados mediante la tinción con SNA (C) y disminuyeron su expresión con el tratamiento de neuraminidasa (D).

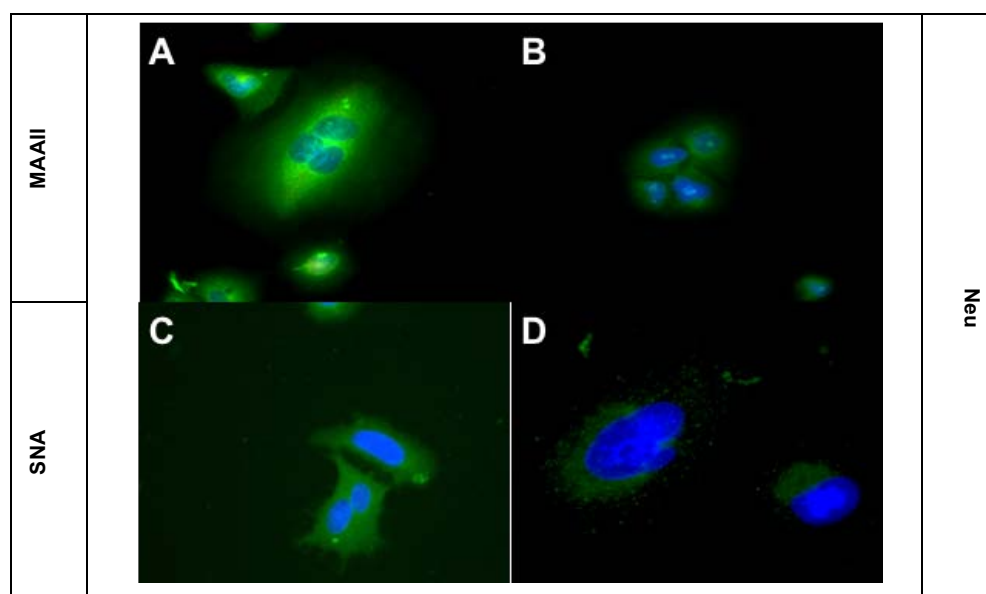


Figura 16. Micrografías de A549 teñidas con MAAII y SNA (20X).

La expresión de los receptores SA- α 2,3 en la línea A549 se evidenció mediante la tinción con la lectina MAAII (A) que al ser tratada con neuraminidasa disminuyó su expresión (B). Los receptores SA- α 2,6 también se encontraron expresados mediante la tinción con SNA (C) y disminuyeron su expresión con el tratamiento de neuraminidasa (D).

Con los resultados de fluorescencia obtenidos mediante la evaluación de micrografías en ImageJ se realizó una comparación entre tratamientos mediante la prueba de Tukey. No se encontró diferencia estadísticamente significativa ($p > 0.05$) entre SA- α 2,3 y SA- α 2,6 en MDCK. En la línea A549 se encontró una diferencia significativa ($p < 0.05$) entre los dos receptores, donde SA- α 2,6 obtuvo los valores más altos. La disminución en la fluorescencia entre las células tratadas con Neu y las que no fueron sometidas al tratamiento también presentaron una diferencia significativa ($P < 0.05$) (*Anexo 1*).

11.2. Dinámica de infección de los virus de influenza porcina en MDCK y A549.

Durante la observación directa al microscopio invertido se pudo apreciar una disminución en el porcentaje de confluencia del monoestrato celular (reducción en la viabilidad celular) en ambas líneas celulares MDCK (**Figura 17**) y A549 (**Figura 18**), acompañado del redondeamiento y flotación de varias células en el sobrenadante como

indicativo de la lisis celular, mientras que en los pozos que no fueron infectados se mantuvo la integridad y confluencia celular. La reducción en el porcentaje de esta viabilidad fue en decremento a partir de las 24 hpi (horas pos infección) hasta obtener un <20% de confluencia a las 72 hpi, a excepción del *A/swine/Mexico/Mex52/2010(H1N1)* el cual mantuvo la viabilidad celular en un 80% (**Figura 19**).

Los resultados de la dinámica de infección de los influenzavirus porcinos en MDCK y A549 se resumen en las **Figura 19** y **Figura 20** donde se muestran: el porcentaje de viabilidad celular, el número de copias obtenidas por reacción de RT-PCR en tiempo real y los títulos hemoaglutinantes de los sobrenadantes celulares de las 0, 24, 48 y 72 hpi.

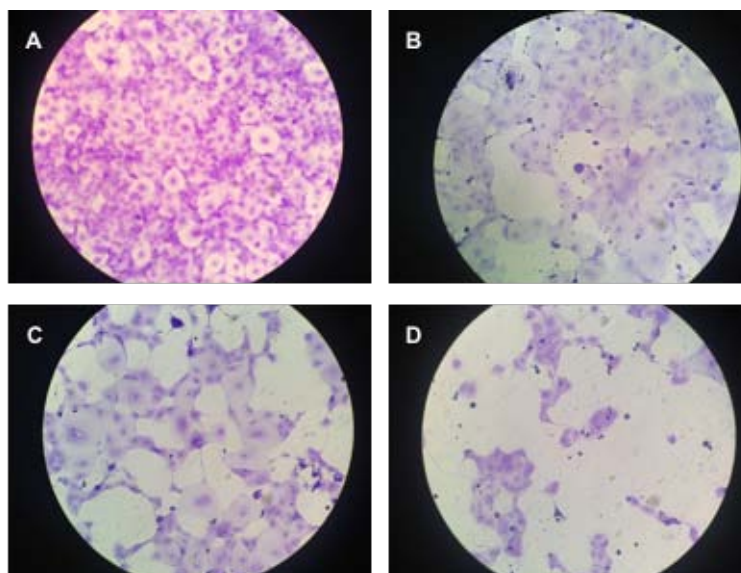


Figura 17. Viabilidad celular en la línea MDCK.

En las imágenes A-D se observan células MDCK infectadas con influenzavirus porcinos mexicanos y teñidas con cristal violeta (20x). Las células antes de la infección así como los controles negativos, presentaron una viabilidad celular mayor al 90% de confluencia (A). A las 24 hpi la mayoría de los influenzavirus disminuyeron la viabilidad celular, presentando un 60-80% de confluencia (B). A las 48 y 72 hpi los cultivos presentaron porcentajes de confluencia de 30-50% (C) o menores a 20% (D).

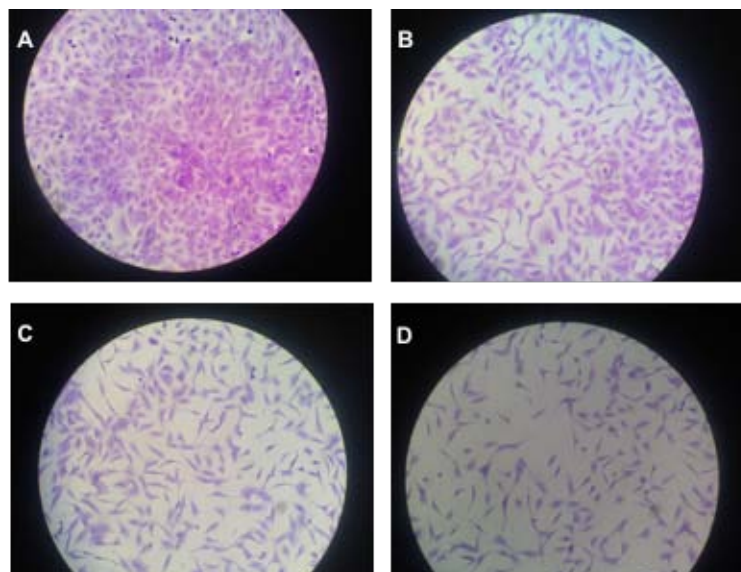


Figura 18. Viabilidad celular en la línea A549.

En las imágenes A-D se observan células A549 infectadas con influenzavirus porcinos mexicanos y teñidas con cristal violeta (20x). Las células antes de la infección así como los controles negativos, presentaron una viabilidad celular mayor al 90% de confluencia (A). A las 24 hpi la mayoría de los influenzavirus disminuyeron la viabilidad celular, presentando un 60-80% de confluencia (B). A las 48 y 72 hpi los cultivos presentaron porcentajes de confluencia de 30-50% (C) o menores a 20% (D).

Los sobrenadantes de infección en ambas líneas fueron positivos al RT-PCR en tiempo real y se obtuvieron diferentes concentraciones expresadas como el número de copias del material genético viral por microlítro (copias/ μ l) con base en la curva estándar y el control negativo utilizados (**Figura 21** y **Figura 22**). Las concentraciones virales obtenidas en el sobrenadante celular de la línea MDCK fueron mayores contra las A549, la emisión de la fluorescencia se presentó entre los ciclos 18-25 (Anexo 3) y 22-27 (Anexo 4), respectivamente. El virus que presentó mayor concentración en ambas líneas celulares fue el *A/swine/Mexico/Mex51/2010(H3N2)*, seguido por *A/swine/Mexico/Ver37/2010(H1N1)* y *A/swine/Mexico/Mich40/2010(H3N2)*, y por último *A/swine/Mexico/Mex52/2010(H1N1)*.

		MDCK				A549			
		Horas post- infección							
		0	24	48	72	0	24	48	72
A/swine/Mexico/Ver37/2010 (H1N1)	Viabilidad celular (%)	100.00	80.00	50.00	20.00	100.00	80.00	50.00	20.00
	Copias por reacción (log10)	0.00	6.13	6.22	5.62	0.00	4.81	4.61	4.41
	UHA (log2)*	0.00	2.00	4.00	4.00	0.00	1.00	0.00	2.00
A/swine/Mexico/Mex52/2010 (H1N1)	Viabilidad celular (%)	100.00	100.00	80.00	80.00	100.00	100.00	80.00	80.00
	Copias por reacción (log10)	0.00	5.66	6.05	6.07	0.00	4.52	4.62	4.49
	UHA (log2)	0.00	1.00	1.00	2.00	0.00	1.00	0.00	1.00
A/swine/Mexico/Mich40/2010 (H3N2)	Viabilidad celular (%)	100.00	80.00	20.00	20.00	100.00	80.00	50.00	20.00
	Copias por reacción (log10)	0.00	5.82	5.88	6.15	0.00	4.83	4.69	4.85
	UHA (log2)	0.00	4.00	4.00	4.00	0.00	0.00	2.00	1.00
A/swine/Mexico/Mex51/2010 (H3N2)	Viabilidad celular (%)	100.00	50.00	20.00	20.00	100.00	50.00	20.00	20.00
	Copias por reacción (log10)	0.00	6.55	6.45	6.00	0.00	5.31	5.50	5.52
	UHA (log2)	0.00	3.00	4.00	4.00	0.00	0.00	0.00	2.00

Figura 19. Resultados de la infección por influenzavirus porcinos en células MDCK y A549.

Los títulos hemoaglutinantes presentaron variaciones más evidentes entre ambas líneas, ya que en los sobrenadantes de las A549 no existió título para todos los tiempos colectados (**Figura 19** y **Figura 20**). En las MDCK los mayores títulos fueron de 1:16 UHA para todos los virus excepto para *A/swine/Mexico/Mex52/2010(H1N1)* cuyo mayor título fue de 1:4 UHA. Para las A549 los mayores títulos fueron de 1:4 UHA, sin embargo en al menos un tiempo de colección para todos los virus no se presentó título aglutinante principalmente a las 48 hpi.

El decremento en la viabilidad celular coincidió con el incremento en el número de copias virales y el título hemoaglutinante en ambas líneas celulares en la mayoría de los virus a excepción del *A/swine/Mexico/Mex52/2010(H1N1)*, el cual presentó los menores títulos virales con la mayor viabilidad celular. *A/swine/Mexico/Mex51/2010(H3N2)* obtuvo el mayor número de copias virales y el decremento en la viabilidad celular fue hasta el 50% a las 24 hpi, sin embargo no obtuvo título hemaglutinante en A549 sino hasta las 72 hpi.

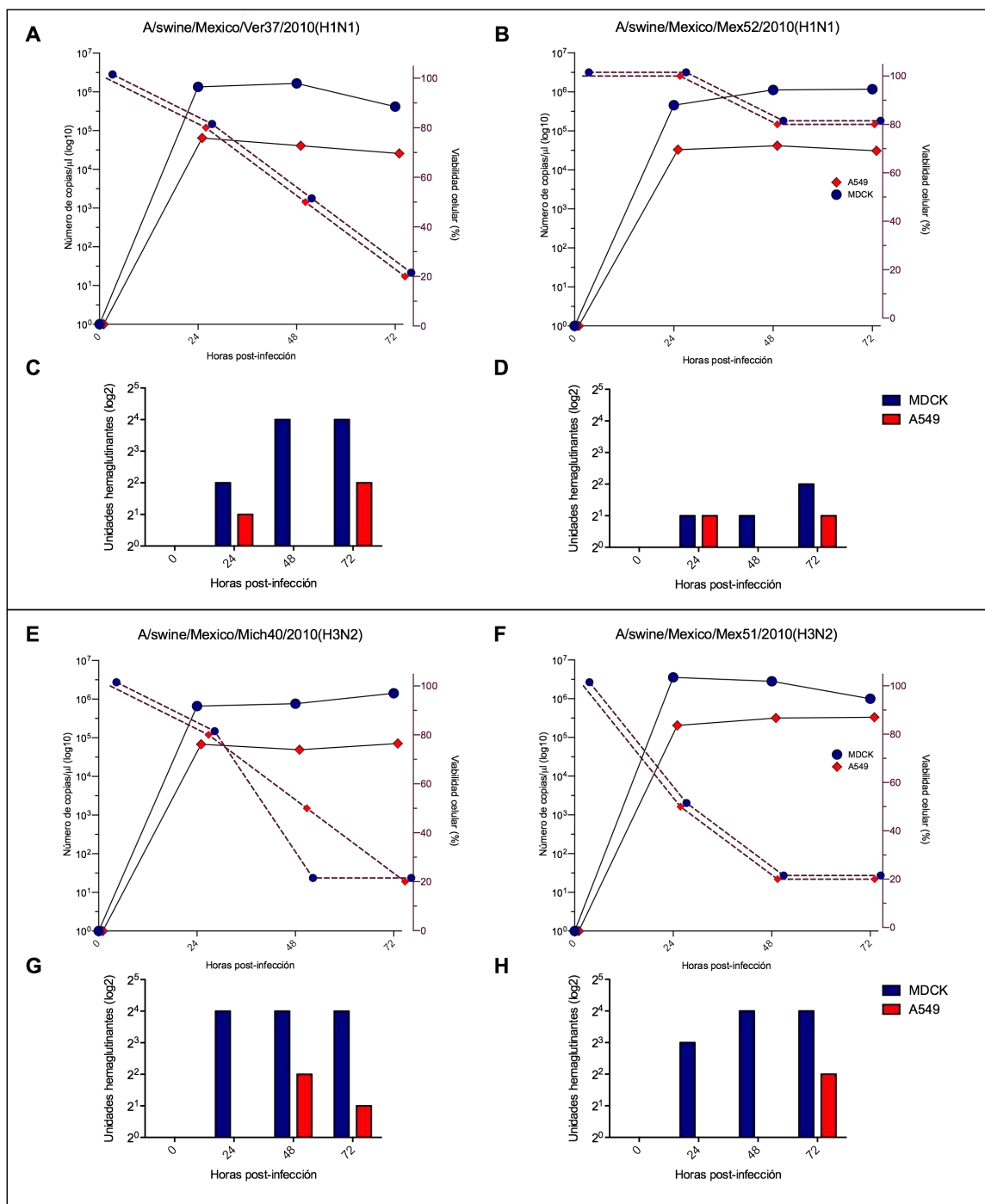
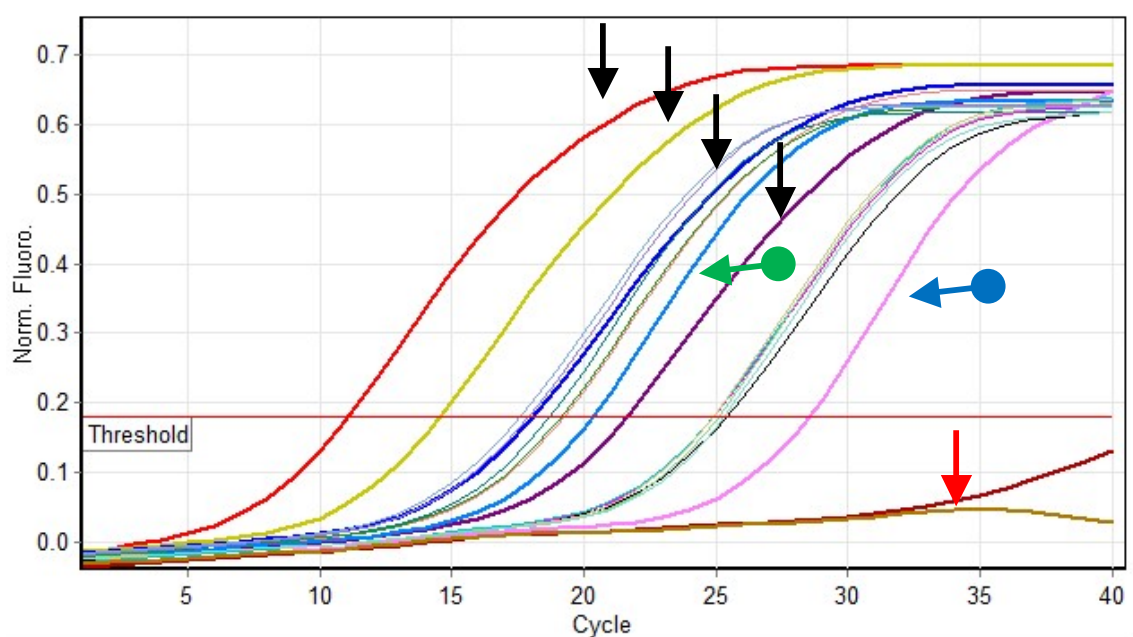


Figura 20. Dinámica de infección de los influenzavirus porcinos mexicanos en MDCK y A549.

La dinámica de infección celular en MDCK (azul) y A549 (rojo) de los cuatro virus se muestra en las gráficas A a la H. En las gráficas A, B, E y D se observa que los virus porcinos presentaron los mayores títulos de copias virales en las MDCK contra los obtenidos en A549. Además se observa que hubo una disminución en la viabilidad celular llegando al 20% a las 72 hpi en ambas líneas, a excepción de Mex/52 que fue de 80% (B). En las gráficas C, D, G y H se presentan los títulos aglutinantes para los cuatro virus en las dos líneas, obteniendo mayores títulos las MDCK (azul) mientras que en las A549 (rojo) no se obtuvo título para todos los tiempos.

Quantitation data for Cycling B.Green



Standard Curve

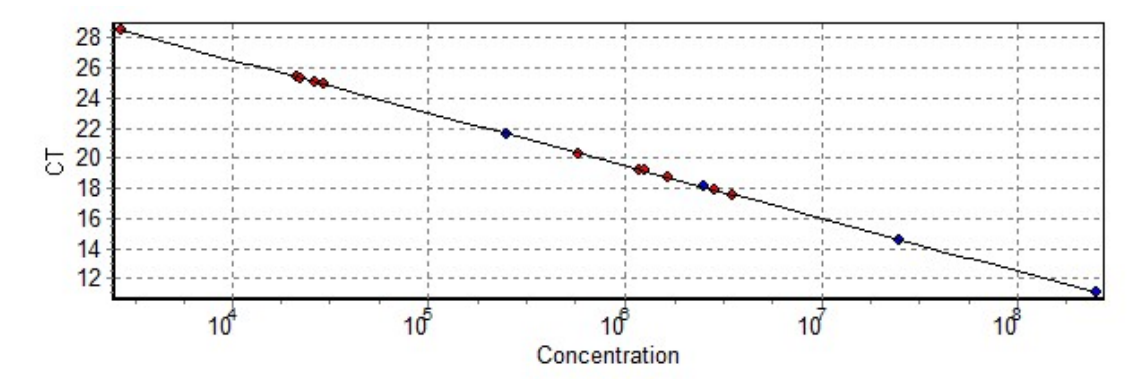
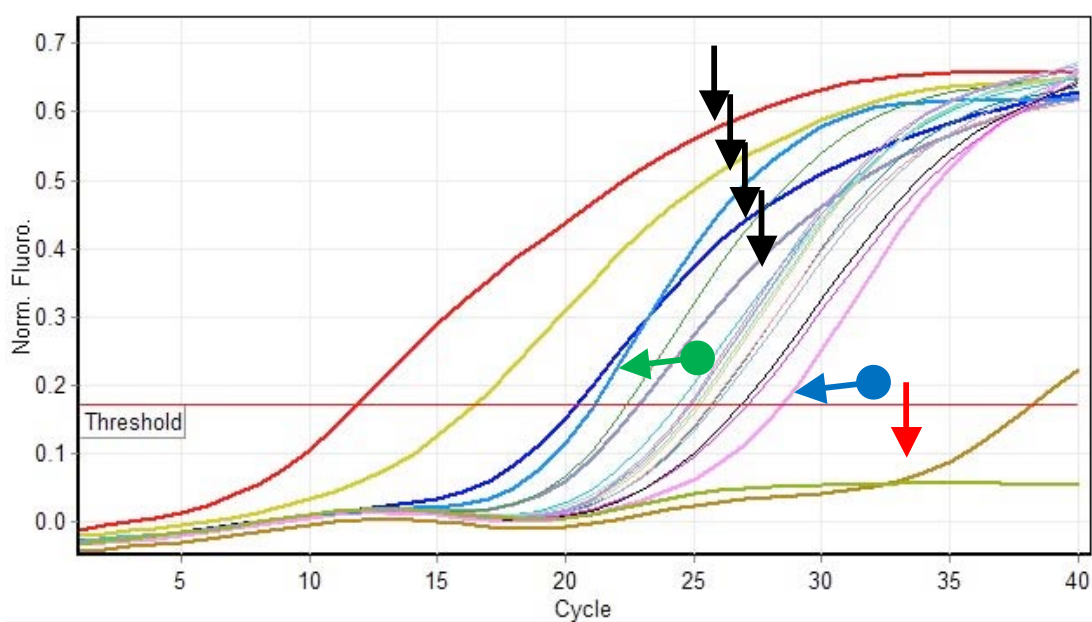


Figura 21. Cuantificación por RT-PCR en tiempo real en la infección viral en MDCK.

Para la cuantificación en la RT-PCR en tiempo real se utilizó la curva estándar de cuatro diluciones décuples (flechas negras), el control positivo 1:128 UHA (flecha verde), el control positivo de 1000 copias/ μ l (flecha azul) y los controles negativos: células sin infectar y sin templado (flecha roja). Los resultados de la infección con los influenzavirus porcinos mexicanos presentaron una emisión de fluorescencia en los ciclos 18-25.

Quantitation data for Cycling B.Green



Standard Curve

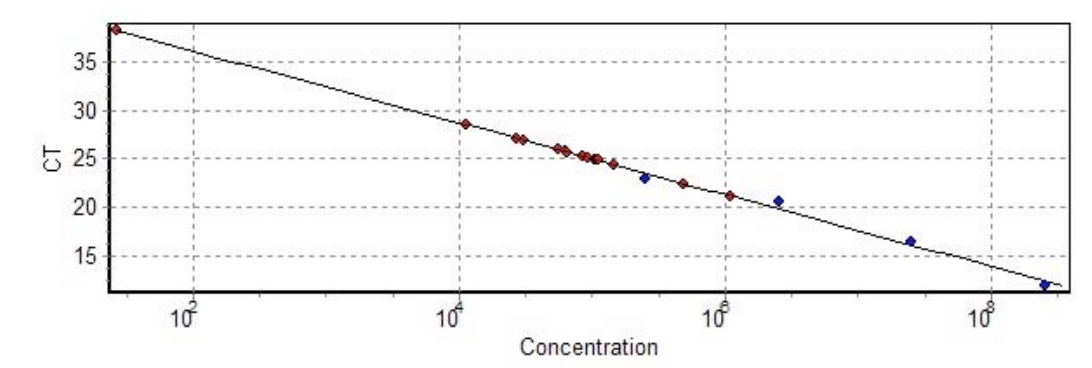


Figura 22. Cuantificación por RT-PCR en tiempo real en la infección viral en A549

Para la cuantificación en la RT-PCR en tiempo real se utilizó la curva estándar de cuatro diluciones décuples (flechas negras), el control positivo 1:128 UHA (flecha verde), el control positivo de 1000 copias/ μ l (flecha azul) y los controles negativos: células sin infectar y sin templado (flecha roja). Los resultados de la infección con los influenzavirus porcinos mexicanos presentaron una emisión de fluorescencia en los ciclos 22-27.

12. DISCUSIÓN

La interacción de los virus de influenza entre cerdos y humanos se reconoce desde el año 1918 luego de la pandemia de ‘Gripe Española’ de la cual la teoría más aceptada es que el virus fue transmitido de los humanos a los cerdos dando origen al virus de la influenza porcina clásica (71,72) el cual se mantuvo en circulación en las poblaciones porcinas del mundo. Posteriormente a finales de la década de los 90’s surge en los cerdos un virus rearreglante con genes del subtipo H3N2 de la influenza estacional humana, además de los genes de la influenza porcina clásica; este nuevo subtipo se estableció de manera endémica en la población porcina americana (63,73). Fue hasta el año 2009 cuando esta interacción humano-cerdo despertó el interés de la comunidad debido al surgimiento del virus H1N1pdm09 el cual en su composición cuenta con genes de los subtipos endémicos en cerdos además de los genes M y NA de origen porcino circulante en Europa y Asia (59,74). Este virus presentó además algunos factores de virulencia que favorecieron su adaptación en la población humana, como la afinidad por los SA- α 2,6 en el sitio de unión al receptor (RBS) de la hemaglutinina (75).

Otros casos de infecciones por influenzavirus porcinos en humanos después del año 2009 se presentaron en el 2011 en ferias agropecuarias de EUA en donde concurren una gran cantidad de animales provenientes de diversos estados del país así como una gran cantidad de personas que asisten como visitantes y expositores. Los Centros para el Control y la Prevención de las Enfermedades (CDC, por sus siglas en inglés) reportaron una variante del subtipo H3N2 (H3N2v) que presenta la introducción del gen M del H1N1pdm09 y que ocasionó un cuadro clínico en varios de los asistentes a estas ferias (76,77). Las infecciones humano-cerdo se presentan con frecuencia como un riesgo ocupacional (17), sin embargo en Europa se han presentado casos de infecciones en personas inmuno-comprometidas que habitan cerca de las unidades de producción porcina (78).

En el presente trabajo se propuso evaluar el riesgo de infección de los influenzavirus porcinos mexicanos rearreglantes aislados durante los meses posteriores al surgimiento del H1N1pdm09 en células de origen humano y los resultados obtenidos demuestran que las células A549 fueron susceptibles y permisivas a la infección por estos influenzavirus. La

susceptibilidad de infección de los influenzavirus porcinos está dada por la presencia de los receptores SA- α 2,3 y SA- α 2,6 mientras que los de origen humano lo hacen principalmente para los de conformación SA- α 2,6. La línea celular A549 ha sido utilizada como modelo de infección *in vitro* de algunos influenzavirus ya que presentan SA- α 2,3 y SA- α 2,6 en su superficie (79) lo que ha permitido la infección de virus aviares de baja patogenicidad así como de virus humanos, incluido el pandémico (69,80). Para evaluar el potencial de transmisión de virus de influenza aviar H6, Wang *et al.* (81) utilizaron la línea celular A549 como modelo humano *in vitro* y demostraron que los IAV replicaron eficientemente en estas células. Por otra parte, un grupo de investigadores en China realizaron infecciones de influenzavirus porcinos en células A549 y determinaron las proteínas citoplasmáticas, nucleares y mitocondriales expresadas durante la infección viral (82,83). La permisividad de las células A549 por influenzavirus porcinos permite contar con un modelo de estudio *in vitro* para comprender la dinámica infecciosa de estos virus en un hospedero humano.

Los títulos virales obtenidos en las células MDCK y A549 presentaron diferencias, siendo mayores los títulos en las MDCK. Las células epiteliales caninas MDCK son consideradas la línea de elección para el aislamiento de diversos influenzavirus (84), esta cualidad se atribuye no únicamente a la presencia de los receptores SA- α 2,3 y SA- α 2,6 sino también a la expresión de algunos factores intrínsecos como la incapacidad de algunas de sus proteínas (Mx1 canina) para inhibir al interferón (IFN), lo cual favorece la eficiente replicación de los IAV (85,86). Además estas células han sido empleadas en años recientes para la producción de vacunas contra el virus de influenza, ya que comparadas con otras líneas como las Vero y A549, se pueden obtener títulos virales más elevados y por su velocidad de replicación soportan producciones a gran escala en biorreactores (84,87,88). Hause *et al.* (89) observaron que los Influenzavirus tipo C porcinos replicaron en menor medida en A549 contra otras líneas celulares incluida la MDCK. Debido a los factores presentes en las células MDCK, éstas favorecen una replicación más eficiente de los IAV que permiten alcanzar títulos mayores contra otras líneas por lo cual en este trabajo se pueden considerar como un control de infección ya que invariablemente se consideran susceptibles y permisivas a la infección por influenzavirus porcinos.

La línea celular A549 al derivarse de tejido alveolar representa un modelo humano ideal para el estudio *in vitro* de IAV, sin embargo sería conveniente realizar ensayos de infección

en células de las diferentes regiones topológicas del tracto respiratorio humano para así poder evaluar la dinámica que se presenta en los diferentes niveles anatómicos, ya que en las vías altas se da el primer contacto con el virus en una infección natural.

Los cuatro diferentes influenzavirus porcinos se replicaron en ambas líneas celulares, de acuerdo a los resultados por RT-PCR cuantitativo así como por el ECP, sin embargo los niveles de replicación entre ellos presentaron diferencias particulares. *A/swine/Mexico/Mex51/2010(H3N2)* obtuvo el mayor número de copias virales ($10^{6.55}$) y la viabilidad celular disminuyó hasta el 50% a las 24 hpi. Seguido a éste se encuentran *A/swine/Mexico/Ver37/2010(H1N1)*, *A/swine/Mexico/Mich40/2010(H3N2)* y *A/swine/Mexico/Mex52/2010(H1N1)*. Éste último virus mantuvo la viabilidad celular en un 80% hasta las 72 hpi, así como un número de copias virales constante que parece ir en aumento con el paso del tiempo. Mientras que *A/swine/Mexico/Mex51/2010(H3N2)* presentó un comportamiento más virulento comparado con los otros virus, *A/swine/Mexico/Mex52/2010(H1N1)* podría no ser lo suficientemente virulento para generar un efecto citopático a las pocas hpi. El decremento en el número de copias virales a partir de las 48 hasta las 72 hpi en *A/swine/Mexico/Ver37/2010(H1N1)* y *A/swine/Mexico/Mex51/2010(H3N2)* puede relacionarse con la escasa viabilidad celular, ya que los IAV carecen del sustrato para su replicación; contrario a lo ocurrido en *A/swine/Mexico/Mex52/2010(H1N1)* y *A/swine/Mexico/Mich40/2010(H3N2)* donde a las 72 hpi se presentó un mayor número de copias virales y la viabilidad celular se mantuvo en un 80%; excepto para *A/swine/Mexico/Mich40/2010(H3N2)* donde la viabilidad celular fue del 20% a las 72 hpi. Lo anterior debe ser considerado para aumentar el tiempo de infección y coleccionar sobrenadantes después de las 72 hpi al menos en *A/swine/Mexico/Mex52/2010(H1N1)* para continuar obteniendo títulos virales.

Los títulos virales por subtipos H1N1 y H3N2 de origen humano en células MDCK fueron mayores para H1N1 de acuerdo a lo reportado por Lugostev *et al.* (90) mientras que Hamilton *et al.* (91) obtuvieron títulos mayores con H3N2, similar a lo sucedido con *A/swine/Mexico/Mex51/2010(H3N2)* en este estudio, sin embargo cada virus presentó un comportamiento diferente de acuerdo a su propia biología lo cual podría no estar asociado directamente con el subtipo.

Para explicar las posibles causas de esta diferencia en la virulencia de cada uno de los influenzavirus, se analizaron las secuencias de aminoácidos del segmento de la hemaglutinina (HA), comparándolas entre los dos aislados utilizados del mismo subtipo, sin embargo no se encontraron diferencias. Las diferencias en la virulencia de cada uno de los virus podría estar determinada en otros genes involucrados en el ciclo de replicación viral como el complejo de las polimerasas, los cuales no fueron analizados en este trabajo.

Existen algunos aminoácidos descritos para que la HA cumpla su función biológica, una de estas funciones reside en la especificidad por el receptor SA- α 2,6 en H1 que se encuentra dada por las mutaciones E190D y D225G (92,93) y en los influenzavirus porcinos mexicanos tanto *A/swine/Mexico/Ver37/2010* como *A/swine/Mexico/Mex52/2010* presentan E190D mientras que en la posición 225 conservan al aspartato (D). La presencia de al menos una estas mutaciones puede explicar su capacidad para unirse a los receptores de las células humanas SA- α 2,6. Por otra parte, existen algunos residuos aviares responsables de la capacidad de unión a los receptores SA- α 2,3 y se encuentran en Q226 y G228 (50); ambos influenzavirus porcinos mexicanos presentan la primera en tanto que la segunda corresponde a G228A (Anexo 5). La alanina (A) pertenece al mismo grupo de aminoácidos que la lisina (G) lo cual pudiera no presentar variación en su función por lo tanto la presencia de estas mutaciones favorece la afinidad por los SA- α 2,3. Además, la presencia de Q/R en la posición 226 se asocia con la afinidad del H1N1pdm09 por SA- α 2,6 así como una mayor virulencia del mismo (94,95); *A/swine/Mexico/Ver37/2010* presenta la glutamina (Q) lo que podría sugerir la virulencia que éste tuvo, sin embargo a pesar de que *A/swine/Mexico/Mex52/2010* también la presenta no se observó el mismo comportamiento virulento.

En los subtipos H3 existen también algunas mutaciones asociadas con la afinidad por SA- α 2,6 y estas están dadas por Q226L y G228S (96,97); *A/swine/Mexico/Mich40/2010* y *A/swine/Mexico/Mex51/2010* presentan Q226I donde la isoleucina (I) pertenece al mismo grupo de aminoácidos que la leucina y además G228S se encuentra en ambos virus por lo tanto estas mutaciones sugieren la susceptibilidad de infección por SA- α 2,6. Estos influenzavirus porcinos mexicanos presentan además una inserción de una asparagina (N) en la posición 24 que no se encuentra en otros influenzavirus porcinos, esta particularidad

representa una oportunidad para considerar si este cambio tiene implicaciones en la función biológica de estos virus.

Los títulos hemaglutinantes obtenidos para los sobrenadantes de infección fueron relativamente bajos e incluso inexistentes en las células A549. En un estudio con IAV H3N2 de humanos que fueron titulados por hemaglutinación con eritrocitos de diferentes especies se demostró que las UHA fueron menores ($<1:2$) con eritrocitos de ave contra los obtenidos con eritrocitos de humano (98). Además, esta disminución en la aglutinación con eritrocitos de ave se asoció con las mutaciones Q194I, V226I y A138S/T, entre otras (79,98,99); en el caso de los influenzavirus porcinos mexicanos se encontró A138S y V226I lo cual podrían explicar los bajos títulos obtenidos.

La identificación de los ácido siálicos mediante el uso de las lectinas específicas *Maackia amurensis* y *Sambucus nigra* con afinidad por los SA- α 2,3 y SA- α 2,6 respectivamente, demostró la presencia de ambos receptores en las células MDCK y A549. En las MDCK no se encontró diferencia significativa entre ambos receptores, mientras que las A549 presentaron una proporción significativamente mayor de SA- α 2,6 contra SA- α 2,3 (Anexo 1) lo cual concuerda con los resultados de Sauer *et al.* (100) quienes utilizando el mismo software (ImageJ) para la evaluación de la emisión de la fluorescencia observaron un comportamiento similar. Por otra parte, en la tesis de doctorado de Vicente (2017, en desarrollo) la expresión de estos receptores se realizó mediante citometría de flujo; la cual es una herramienta mucho más sensible y específica; las MDCK y A549 expresaron en mayor proporción al SA- α 2,6 contra el SA- α 2,3 aunque con una menor intensidad en MDCK (Anexo 2), lo cual es similar a lo reportado por Sieben *et al.* (101) utilizando la misma técnica. Estos resultados explican la susceptibilidad de infección de las células MDCK y A549 por influenzavirus porcinos, sin embargo si bien la expresión de los receptores celulares es el primer requisito para el reconocimiento viral, no es el único factor involucrado en el proceso de infección (79) por lo cual sería necesario utilizar otras técnicas para evaluar el comportamiento de los IAV porcinos en células humanas.

Finalmente, la RT-PCR cuantitativa es una herramienta de gran utilidad en la evaluación de la dinámica de infección de los IAV ya que se ha demostrado que la carga viral determinada por RT-PCR en tiempo real se asocia con la severidad de la enfermedad (102). Además, esta técnica es altamente sensible para detectar las partículas infecciosas ya que

las no infecciosas degeneran en segmentos de ARN incompletos que no son estimados mediante la RT-PCR (103,104). Es conveniente utilizar una segunda técnica cuantitativa como la formación de placas, la hemaglutinación; entre otras, además de la RT-PCR en tiempo real para poder modelar el comportamiento de los IAV en los diferentes estadios de su ciclo replicativo (104).

13. CONCLUSIONES

Los influenzavirus porcinos mexicanos fueron capaces de infectar las células de origen humano A549.

La presencia de los receptores de ácido siálico $\alpha 2,3$ y $\alpha 2,6$ fue demostrada mediante el uso de las lectinas específicas *Maackia amurensis* y *Sambucus nigran* en las líneas celulares MDCK y A549.

Los influenzavirus porcinos mexicanos presentaron diferentes niveles de replicación en ambas líneas celulares, siendo las MDCK las células que presentaron títulos mayores de hasta un logaritmo de diferencia contra los obtenidos en las A549.

Cada uno de los influenzavirus porcinos mexicanos exhibió una dinámica de infección particular y constante en ambas líneas celulares.

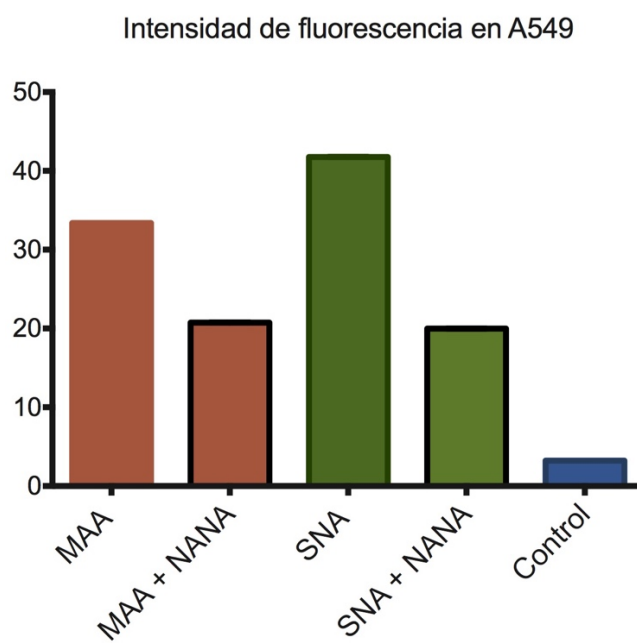
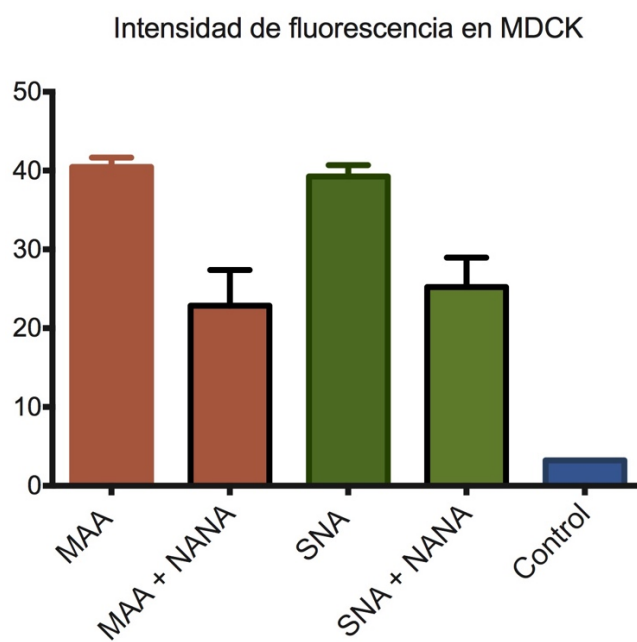
A/swine/Mexico/Mex51/2010(H3N2) presentó un comportamiento más virulento comparado con los demás influenzavirus utilizados en este trabajo.

A/swine/Mexico/Mex52/2010(H1N1) no presentó un comportamiento virulento al mantener la viabilidad celular en un 80% hasta las 72 hpi.

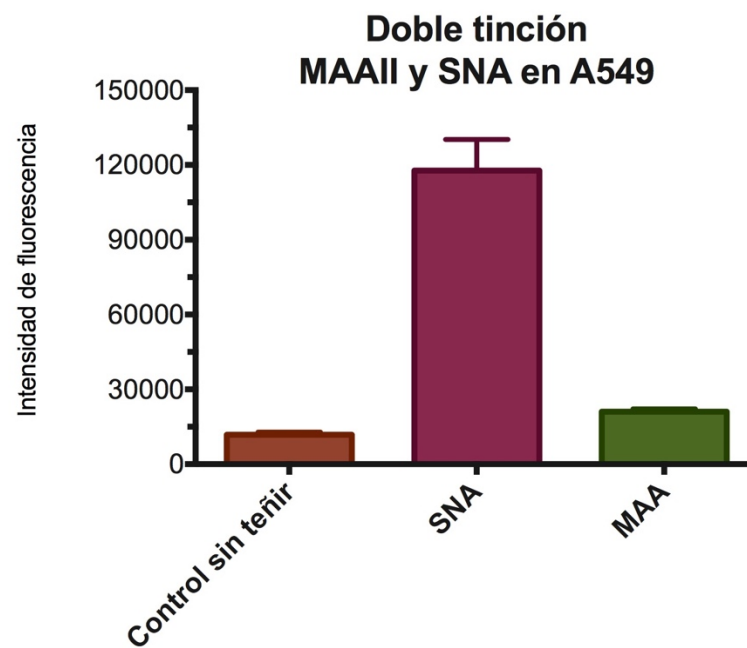
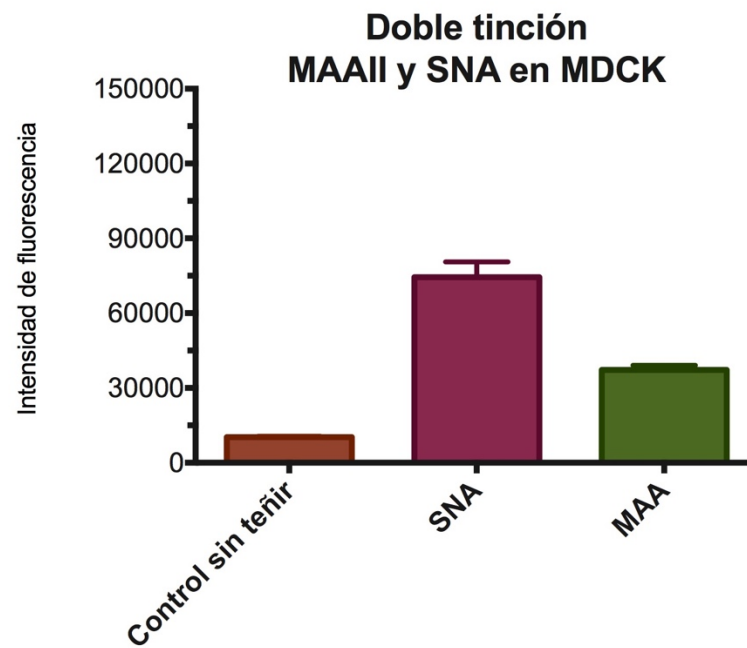
Los resultados de este trabajo demostraron que al menos en condiciones *in vitro* los influenzavirus porcinos mexicanos poseen la capacidad de infectar células de origen humano que expresen los receptores SA- $\alpha 2,3$ y SA- $\alpha 2,6$.

ANEXOS

Anexo 1. Fluorescencia en las micrografías de MDCK y A549.



Anexo 2. Fluorescencia por citometría de flujo en MDCK y A549.



Anexo 3. Resultados de la RT-PCR de la infección viral en MDCK.

No.	Colour	Name	Type	Ct
1		1ng/rx	Standard	11.09
2		0.1ng/rx	Standard	14.56
3		0.01ng/rx	Standard	18.10
4		0.001ng/rx	Standard	21.64
5		Control positivo (10 ⁴)	Positive Control	28.53
6		Control positivo 1:128 UHA	Unknown	20.35
7		AV37 24 hpi	Unknown	18.73
8		AV37 48 hpi	Unknown	19.27
9		AV37 72 hpi	Unknown	19.16
10		AV52 24 hpi	Unknown	24.90
11		AV52 48 hpi	Unknown	25.40
12		AV52 72 hpi	Unknown	24.90
13		AV40 24 hpi	Unknown	24.89
14		AV40 48 hpi	Unknown	25.08
15		AV40 72 hpi	Unknown	25.31
16		AV51 24 hpi	Unknown	17.59
17		AV51 48 hpi	Unknown	17.92
18		AV51 72 hpi	Unknown	19.22
21		Control negativo MDCK	Negative Control	
22		Control negativo	NTC	

Anexo 4. Resultados de la RT-PCR de la infección viral en A549.

No.	Colour	Name	Type	Ct
1		1ng/rx	Standard	11.89
2		0.1ng/rx	Standard	16.47
3		0.01ng/rx	Standard	20.46
4		0.001ng/rx	Standard	22.90
5		Control positivo (10 ⁴)	Positive Control	28.47
6		Control positivo 1:128 UHA	Unknown	21.12
7		AV37 24 hpi	Unknown	25.75
8		AV37 48 hpi	Unknown	25.67
9		AV37 72 hpi	Unknown	22.42
10		AV52 24 hpi	Unknown	27.10
11		AV52 48 hpi	Unknown	26.87
12		AV52 72 hpi	Unknown	24.37
13		AV40 24 hpi	Unknown	25.26
14		AV40 48 hpi	Unknown	25.11
15		AV40 72 hpi	Unknown	24.85
16		AV51 24 hpi	Unknown	25.90
17		AV51 48 hpi	Unknown	24.90
18		AV51 72 hpi	Unknown	24.79
21		Control negativo A549	Negative Control	38.22
22		Control negativo	NTC	

Anexo 5. Mutaciones asociadas a la HA del subtipo A/H1N1.

	Mutaciones únicas								$\alpha 2,6$		$\alpha 2,3$	
	4	122	144	206	220	214	481	514	190	225	226	228
FJ966082 2009 USA H1N1 Human	I	K	A	K	S	K	S	Y	D	D	Q	G
CY034132 1933 United Kingdom H1N1 Human	K	.	K	.	.	T	.	.	E	.	.	.
CY009612 1947 USA H1N1 Human	K	.	K	.	.	T	.	.	.	G	.	.
GQ166223 2009 China H1N1 Human	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
CY035070 1990 USA H1N1 Swine	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.
CY022477 1991 USA H1N1 Swine	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.
AF250124 1999 USA H1N2 Swine	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
AY060047 2001 USA H1N2 Swine	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
AY060048 2001 USA H1N2 Swine	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
AY060050 2001 USA H1N2 Swine	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.
CY157631 2003 USA H1N1 Swine	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
CY159137 2004 USA H1N1 Swine	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
CY157711 2004 USA H1N1 Swine	.	.	V	.	.	.	.	.	.	.	.	.
CY158833 2004 USA H1N1 Swine	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
CY122357 2010 Mexico Mex52 H1N1 Swine	M	N	V	S	T	E	N	F	D	D	.	A
CY122404 2010 Mexico Ver37 H1N1 Swine	M	N	V	S	T	E	N	F	D	D	.	A

REFERENCIAS

1. Morens DM, Taubenberger JK. Historical thoughts on influenza viral ecosystems, or behold a pale horse, dead dogs, failing fowl, and sick swine. *Influenza Other Respi Viruses*. Blackwell Publishing Ltd; el 1 de noviembre de 2010;4(6):327–37.
2. Capua I, Munoz O. Emergence of influenza viruses with zoonotic potential: Open issues which need to be addressed. A review. *Vet Microbiol*. Elsevier B.V.; 2013;165(1–2):7–12.
3. Short KR, Richard M, Verhagen JH, van Riel D, Schrauwen EJA, van den Brand JMA, et al. One health, multiple challenges: The inter-species transmission of influenza A virus. *One Heal*. diciembre de 2015;1:1–13.
4. Webster RG, Bean WJ, Gorman OT, Chambers TM, Kawaoka Y. Evolution and ecology of influenza A viruses. *Microbiol Rev*. American Society for Microbiology (ASM); marzo de 1992;56(1):152–79.
5. Peiris JSM, de Jong MD, Guan Y. Avian influenza virus (H5N1): a threat to human health. *Clin Microbiol Rev*. American Society for Microbiology (ASM); abril de 2007;20(2):243–67.
6. Salomon R, Webster RG. The Influenza Virus Enigma. *Cell*. 2009;136(3):402–10.
7. World Health Organization. FluNet-CHARTS [Internet]. World Health Organization; 2017 [citado el 9 de enero de 2017]. Recuperado a partir de: http://www.who.int/influenza/gisrs_laboratory/flunet/charts/en/
8. OIE, FAO. OFFLU OIE/FAO Network of expertise on animal influenza [Internet]. 2017 [citado el 9 de enero de 2017]. Recuperado a partir de: <http://www.offlu.net/>
9. Cox NJ, Subbarao K. Global Epidemiology of Influenza: Past and Present. *Annu Rev Med*. Annual Reviews; febrero de 2000;51(1):407–21.
10. Molinari NAM, Ortega-Sanchez IR, Messonnier ML, Thompson WW, Wortley PM, Weintraub E, et al. The annual impact of seasonal influenza in the US: Measuring disease burden and costs. *Vaccine*. 2007;25(27):5086–96.
11. Charu V, Chowell G, Palacio Mejia LS, Echevarría-Zuno S, Borja-Aburto VH, Simonsen L, et al. Mortality burden of the A/H1N1 pandemic in Mexico: a comparison of deaths and years of life lost to seasonal influenza. *Clin Infect Dis*. Oxford University Press; noviembre de 2011;53(10):985–93.

12. Belshe RB. The Origins of Pandemic Influenza — Lessons from the 1918 Virus. *N Engl J Med. Massachusetts Medical Society*; el 24 de noviembre de 2005;353(21):2209–11.
13. Morens DM, Taubenberger JK. Pandemic influenza: Certain uncertainties. *Rev Med Virol.* 2011;21(5):262–84.
14. Vincent A, Awada L, Brown I, Chen H, Claes F, Dauphin G, et al. Review of Influenza A Virus in Swine Worldwide: A Call for Increased Surveillance and Research. *Zoonoses Public Health.* 2014;61:4–17.
15. Donovan TS. The role of influenza on growing pig performance. En: Allen D Leman Swine Conference. University of Minnesota Digital Conservancy; 2005. p. 97–8.
16. Crisci E, Mussá T, Fraile L, Montoya M. Review: Influenza virus in pigs. *Mol Immunol.* 2013;55(3):200–11.
17. Gray GC, McCarthy T, Capuano AW, Setterquist SF, Olsen CW, Alavanja MC, et al. Swine workers and swine influenza virus infections. *Emerg Infect Dis. Centers for Disease Control and Prevention*; diciembre de 2007;13(12):1871–8.
18. Shaw ML, Palese P. Orthomyxoviridae. En: Knipe DM, Howley PM, editores. *Fields Virology.* 6th ed. Lippincott Williams & Wilkins; 2013. p. 1151–85.
19. ICTV. Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. King, A., Adams, MJ., Carstens, E., Lefkowitz E, editor. Elsevier Academic Press; 2012.
20. Hause B, Collin E, Liu R, Huang B, Sheng Z, Lu W. Characterization of a novel influenza virus strain in cattle and swine: proposal for a new genus in the Orthomyxoviridae family. *MBio.* 2014;5(2):1–10.
21. Sugawara K, Nishimura H, Hongo S, Kitame F, Nakamura K. Antigenic Characterization of the Nucleoprotein and Matrix Protein of Influenza C Virus with Monoclonal Antibodies. *J Gen Virol. Microbiology Society*; el 1 de enero de 1991;72(1):103–9.
22. Szewczyk B, Bienkowska-Szewczyk K, Krol E. Introduction to molecular biology of influenza a viruses. *Acta Biochim Pol.* 2014;61(3):397–401.
23. Nelson MI, Holmes EC. The evolution of epidemic influenza. *Nat Rev Genet.* 2007;8(3):196–205.

24. Eisefeld AJ, Neumann G, Kawaoka Y. At the centre: influenza A virus ribonucleoproteins. *Nat Rev Microbiol.* Madison, Wisconsin: Nature Pub. Group; enero de 2015;13(1):28–41.
25. Medina R a, García-Sastre A. Influenza A viruses: new research developments. *Nat Rev Microbiol.* Nature Publishing Group; 2011;9(8):590–603.
26. Munoz O, De Nardi M, Van Der Meulen K, Van Reeth K, Koopmans M, Harris K, et al. Genetic Adaptation of Influenza A Viruses in Domestic Animals and Their Potential Role in Interspecies Transmission: A Literature Review. *Ecohealth.* 2015;171–98.
27. Skehel JJ, Wiley DC. Receptor binding and membrane fusion in virus entry: The Influenza Hemagglutinin. *Annu Rev Biochem.* 2000;69(1):531–69.
28. Vanderlinden E, Naesens L. Emerging Antiviral Strategies to Interfere with Influenza Virus Entry. *Med Res Rev.* el 1 de marzo de 2014;34(2):301–39.
29. Webster RG, Bean WJ, Gorman OT, Chambers TM. Evolution and Ecology of Influenza A Viruses. *Microbiol Rev.* 1992;56(1):152–79.
30. Olsen B, Munster V, Wallensten A, Waldenstrom J. Global patterns of influenza A virus in wild birds. *Science* (80-). 2006;(April):3–7.
31. Tong S, Li Y, Rivailler P, Conrardy C, Castillo D a A, Chen L-M, et al. A distinct lineage of influenza A virus from bats. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;109(11):4269–74.
32. Tong S, Zhu X, Li Y, Shi M, Zhang J, Bourgeois M, et al. New World Bats Harbor Diverse Influenza A Viruses. *PLoS Pathog.* 2013;9(10).
33. Scholtissek C. Molecular Evolution of Influenza Viruses. 1996;(2):209–15.
34. Short KR, Richard M, Verhagen JH, van Riel D, Schrauwen EJ a., van den Brand JM a., et al. One health, multiple challenges: The inter-species transmission of influenza A virus. *One Heal.* 2015;1:1–13.
35. Murphy BR, Clements ML. The systemic and mucosal immune response of humans to influenza A virus. *Curr Top Microbiol Immunol.* GERMANY, WEST: Springer Verlag; 1989;146:107–16.
36. Carrat F, Flahault A. Influenza vaccine : The challenge of antigenic drift. *Vaccine.* 2007;25:6852–62.

37. Holmes EC, Ghedin E, Miller N, Taylor J, Bao Y, George KS, et al. Whole-Genome Analysis of Human Influenza A Virus Reveals Multiple Persistent Lineages and Reassortment among Recent H3N2 Viruses. *PLoS Biol.* 2005;3(9).
38. Taubenberger JK, Kash JC. Review Influenza Virus Evolution , Host Adaptation , and Pandemic Formation. *Cell Host Microbe.* Elsevier Inc.; 2010;7(6):440–51.
39. WHO Collaborating Centre for Influenza. WHO Collaborating Centre for Reference and Research on Influenza (VIDRL) [Internet]. 2017 [citado el 16 de enero de 2017]. Recuperado a partir de: <http://www.influenzacentre.org/>
40. Hirst GK. The Agglutination of Red Cells by Allantoic Fluid of Chick Embryos Infected with Influenza Virus. *Sci VO* - 94. The Science Press; 1941;(2427):22.
41. Gottschalk A. Neuraminidase: the specific enzyme of influenza virus and *Vibrio cholerae*. *Biochim Biophys Acta.* Elsevier Pub. Co; marzo de 1957;23(3):645–6.
42. Fuentes G. Participación del ácido siálico en las interacciones tempranas del virus dengue con células diana (monocitos y hepatocitos) [TESIS DE MAESTRÍA]. Universidad Nacional Autónoma de México; 2012.
43. Varki A. Glycan-based interactions involving vertebrate sialic-acid-recognizing proteins. *Nature.* 2007;446(7139):1023–9.
44. Varki A, Schauer R. Sialic Acids. En: Varki A, Cummings RD, Esko J, editores. *Essentials of Glycobiology.* 2nd ed. Cold Spring Harbor, New York : Cold spring harbor laboratory, 2009; 2009.
45. Klukova L, Bertok T, Tkac J. Analytical Methods Nanoscale-controlled architecture for the development of ultrasensitive lectin biosensors applicable in glycomics. *Anal Methods.* 2014;6:4922–31.
46. Wilson I a, Skehel JJ, Wiley DC. Structure of the haemagglutinin membrane glycoprotein of influenza virus at 3 Å resolution. *Nature.* 1981;289(5796):366–73.
47. Rogers GN, Paulson JC. Receptor determinants of human and animal influenza virus isolates: differences in receptor specificity of the H3 hemagglutinin based on species of origin. *Virology.* UNITED STATES: Academic Press; junio de 1983;127(2):361–73.
48. Nobusawa E, Aoyama T, Kato H, Suzuki Y, Tateno Y, Nakajima K. Comparison of complete amino acid sequences and receptor-binding properties among 13 serotypes

- of hemagglutinins of influenza A viruses. *Virology*. Department of Microbiology, Institute of Public Health, Tokyo, Japan.: Academic Press; junio de 1991;182(2):475–85.
49. Gambaryan AS, Tuzikov AB, Piskarev VE, Yamnikova SS, Lvov DK, Robertson JS, et al. Specification of receptor-binding phenotypes of influenza virus isolates from different hosts using synthetic sialylglycopolymers: non-egg-adapted human H1 and H3 influenza A and influenza B viruses share a common high binding affinity for 6'-sialyl(N-ace. *Virology*. Moscow, Russia: Academic Press; junio de 1997;232(2):345–50.
 50. Matrosovich M, Tuzikov A, Bovin N, Gambaryan A, Klimov A, Castrucci MR, et al. Early alterations of the receptor-binding properties of H1, H2, and H3 avian influenza virus hemagglutinins after their introduction into mammals. *J Virol*. 2000;74(18):8502–12.
 51. Nicholls JM, Bourne AJ, Chen H, Guan Y, Peiris M. Sialic acid receptor detection in the human respiratory tract: evidence for widespread distribution of potential binding sites for human and avian influenza viruses. 2007;1:1–11.
 52. Nelli RK, Kuchipudi S V, White GA, Perez BB, Dunham SP. Comparative distribution of human and avian type sialic acid influenza receptors in the pig. *BMC Vet Res*. 2010;6(4).
 53. França M, Stallknecht D, Howerth E. Expression and distribution of sialic acid influenza virus receptors in wild birds. *Avian Pathol*. 2013;42(1):60–71.
 54. Kirkeby S, Martel CJM, Aasted B. Infection with human H1N1 influenza virus affects the expression of sialic acids of metaplastic mucous cells in the ferret airways. *Virus Res*. 2009;144:225–32.
 55. Connor RJ, Kawaoka Y, Webster RG, Paulson JC. Receptor specificity in human, avian, and equine H2 and H3 influenza virus isolates. *Virology*. Academic Press; el 15 de noviembre de 1994;205(1):17–23.
 56. Qi L, Davis AS, Jagger BW, Schwartzman LM, Dunham EJ, Kash JC, et al. Analysis by Single-Gene Reassortment Demonstrates that the 1918 Influenza Virus Is Functionally Compatible with a Low-Pathogenicity Avian Influenza Virus in Mice. *J Virol*. 2012;86(17):9211–20.

57. Scholtissek C, Rohde W, Von Hoyningen V, Rott R. On the origin of the human influenza virus subtypes H2N2 and H3N2. *Virology*. Academic Press; junio de 1978;87(1):13–20.
58. Hancock K, Veguilla V, Xiuhua Lu, Zhong W, Butler EN, Sun H, et al. Cross-Reactive Antibody Responses to the 2009 Pandemic H1N1 Influenza Virus. *N Engl J Med*. 2009;361(20):1945–52.
59. Garten RJ, Davis CT, Russell CA, Shu B, Lindstrom S, Balish A, et al. Antigenic and Genetic Characteristics Influenza Viruses Circulating in Humans. *Science* (80-). 2009;325:197–201.
60. Kida H, Ito T, Yasuda J, Shimizu Y, Itakura C, Shortridge KF, et al. Potential for transmission of avian influenza viruses to pigs. *J Gen Virol*. Department of Veterinary Hygiene and Microbiology, School of Veterinary Medicine, Hokkaido University, Sapporo, Japan.: Microbiology Society; septiembre de 1994;75 (Pt 9):2183–8.
61. Kundin WD. Hong Kong A-2 Influenza Virus Infection among Swine during a Human Epidemic in Taiwan. *Nature*. el 28 de noviembre de 1970;228(5274):857.
62. Shope RE. The Etiology of Swine Influenza. *Science*. United States: American Association for the Advancement of Science; el 20 de febrero de 1931;73(1886):214–5.
63. Zhou NN, Senne DA, Landgraf JS, Swenson SL, Erickson G, Rossow K, et al. Genetic Reassortment of Avian , Swine , and Human Influenza A Viruses in American Pigs. *J Virol*. 1999;73(10):8851–6.
64. Brown IH, Harris PA, Alexander DJ, McCauley JW. Multiple genetic reassortment of avian and human influenza A viruses in European pigs, resulting in the emergence of an H1N2 virus of novel genotype. *J Gen Virol*. enero de 1998;79(12):2947–55.
65. Smith GJD, Vijaykrishna D, Bahl J, Lycett SJ, Worobey M, Pybus OG, et al. Origins and evolutionary genomics of the 2009 swine-origin H1N1 influenza A epidemic. *Nature*. Nature Publishing Group; 2009;459(7250):1122–5.
66. Ávalos P. Identificación de variantes del virus de la influenza porcina en México con la técnica de RT-PCR RFLP's. [TESIS DE MAESTRÍA]. Universidad Nacional Autónoma de México; 2012.

67. Carrera VM. Identificación de mutaciones en cuatro genes internos (PB2, PA, NP y M) del virus de influenza porcina aislados en México. [TESIS DE MAESTRÍA]. Universidad Nacional Autónoma de México; 2014.
68. Shinya K, Ebina M, Yamada S, Ono M, Kasai N, Kawaoka Y. Influenza virus receptors in the human airway. *Nature*. 2006;440(7083):435–6.
69. Mukherjee S, Vipat VC, Mishra AC, Pawar SD, Chakrabarti AK. Pandemic (H1N1) 2009 influenza virus induces weaker host immune responses in vitro: a possible mechanism of high transmissibility. *Virology*. 2011;8(140).
70. García-Moreno SA. Perfil de expresión de microRNAs en células A549 infectadas con el virus de influenza pandémica A/H1N1 y el virus de influenza estacional A/PR/8/34. [TESIS DE LICENCIATURA]. Universidad Nacional Autónoma de México; 2013.
71. Shope R. SWINE INFLUENZA. *J Exp Med*. 1931;54(3):373–85.
72. Reid AH, Taubenberger JK. The origin of the 1918 pandemic influenza virus: a continuing enigma. *J Gen Virol*. 2003;84:2285–92.
73. Webby RJ, Swenson SL, Krauss SL, Gerrish PJ, Goyal SM, Webster RG. Evolution of Swine H3N2 Influenza Viruses in the United States. *J Virol* . el 15 de septiembre de 2000;74(18):8243–51.
74. Dawood FS, Jain S, Finelli L, Shaw MW, Lindstrom S, Garten RJ, et al. Emergence of a Novel Swine-Origin Influenza A (H1N1) Virus in Humans Novel Swine-Origin Influenza A (H1N1) Virus Investigation Team*. *N Engl J Med*. 2009;360(25):2605–15.
75. Chen L-M, Rivaller P, Hossain J, Carney P, Balish A, Perry I, et al. Receptor specificity of subtype H1 influenza A viruses isolated from swine and humans in the United States. *Virology*. 2011;412(2):401–10.
76. Lindstrom S, Garten R, Balish A, Shu B, Emery S, Berman L, et al. Human Infections with Novel Reassortant Influenza A(H3N2)v Viruses, United States, 2011. *Emerg Infect Dis*. 2012;18(5):834–7.
77. Bowman AS, Nelson SW, Page SL, Nolting JM, Killian ML, Sreevatsan S, et al. Swine-to-Human Transmission of Influenza A (H3N2) Virus at Agricultural Fairs ,. *Emerg Infect Dis*. 2014;20(9):1472–80.

78. Piralla A, Moreno A, Orlandi ME, Percivalle E, Chiapponi C, Vezzoli F, et al. Swine Influenza A(H3N2) Virus Infection in Immunocompromised Man, Italy, 2014. *Emerg Infect Dis.* 2015;21(7):2014–6.
79. Kumari K, Gulati S, Smith DF, Gulati U, Cummings RD, Air GM. Receptor binding specificity of recent human H3N2 influenza viruses. *Virology*. 2007;4(42):1–12.
80. Sutejo R, Yeo DS, Myaing MZ, Hui C, Xia J, Ko D, et al. Activation of Type I and III Interferon Signalling Pathways Occurs in Lung Epithelial Cells Infected with Low Pathogenic Avian Influenza Viruses. *PLoS One.* 2012;7(3).
81. Wang G, Deng G, Shi J, Luo W, Zhang G, Zhang Q, et al. H6 Influenza Viruses Pose a Potential Threat to Human Health. *J Virol.* 2014;88(8):3953–64.
82. Wu X, Wang H, Bai L, Yu Y, Sun Z, Yan Y, et al. Mitochondrial proteomic analysis of human host cells infected with H3N2 swine influenza virus. *J Proteomics.* 2013;91:136–50.
83. Wu X, Wang H, Bai L, Yu Y, Sun Z, Yan Y, et al. Subcellular proteomic analysis of human host cells infected with H3N2 swine influenza virus. *J Proteomics. Elsevier B.V.*; 2013;91(22):136–50.
84. Hegde NR. Cell culture-based influenza vaccines: A necessary and indispensable investment for the future. *Hum Vaccines Immunother.* 2015;11(5):1223–34.
85. Seitz C, Frensing T, Höper D, Kochs G, Reichl U. High yields of influenza A virus in Madin-Darby canine kidney cells are promoted by an insufficient interferon-induced antiviral state. *J Gen Virol.* 2010;91(7):1754–63.
86. Nishiyama K, Sugawara K, Nouchi T, Kawano N. Purification and cDNA cloning of a novel protease inhibitor secreted into culture supernatant by MDCK cells *. *2008*;36:122–33.
87. Hussain AI, Cordeiro M, Sevilla E, Liu J. Comparison of egg and high yielding MDCK cell-derived live attenuated influenza virus for commercial production of trivalent influenza vaccine: In vitro cell susceptibility and influenza virus replication kinetics in permissive and semi-permissive cells. *Vaccine.* 2010;28(22):3848–55.
88. Torres I. Estandarización de métodos de infección de las líneas celulares MDCK, A549 y Hep-2 con virus de Influenza A. [TESIS DE LICENCIATURA]. Universidad Nacional Autónoma de México; 2013.

89. Hause BM, Ducatez M, Collin EA, Ran Z, Liu R, Sheng Z, et al. Isolation of a Novel Swine Influenza Virus from Oklahoma in 2011 Which Is Distantly Related to Human Influenza C Viruses. *PLoS Pathog.* 2013;9(2):1–11.
90. Lugovtsev VY, Melnyk D, Weir JP, Chan MCW. Heterogeneity of the MDCK Cell Line and Its Applicability for Influenza Virus Research. *PLoS One.* 2013;8(9).
91. Hamilton SB, Wyatt DE, Wahlgren BT, O 'dowd MK, Morrissey JM, Daniels DE, et al. Higher titers of some H5N1 and recent human H1N1 and H3N2 influenza viruses in Mv1 Lu vs. MDCK cells. *Virol J.* 2011;8:66.
92. Gamblin SJ, Haire LF, Russell RJ, Stevens DJ, Xiao B, Ha Y, et al. The Structure and Receptor Binding Properties of the 1918 Influenza Hemagglutinin. *Science* (80-). el 18 de marzo de 2004;303(5665):1838 LP-1842.
93. Soundararajan V, Tharakaraman K, Raman R, Raguram S, Shriver Z, Sasisekharan V, et al. Extrapolating from sequence-the 2009 H1N1 “swine” influenza virus. *Nat Biotech.* Nature Publishing Group; junio de 2009;27(6):510–3.
94. Chutinimitkul S, Herfst S, Steel J, Lowen AC, Ye J, van Riel D, et al. Virulence-Associated Substitution D222G in the Hemagglutinin of 2009 Pandemic Influenza A(H1N1) Virus Affects Receptor Binding . *J Virol.* American Society for Microbiology (ASM); el 15 de noviembre de 2010;84(22):11802–13.
95. Zhang S, Sherwood RW, Yang Y, Fish T, Chen W, McCardle JA, et al. Comparative Characterization of the Glycosylation Profiles of an Influenza Hemagglutinin Produced in Plant and Insect Hosts. *Proteomics.* abril de 2012;12(8):1269–88.
96. Ping J, Dankar SK, Forbes NE, Keleta L, Zhou Y, Tyler S, et al. PB2 and Hemagglutinin Mutations Are Major Determinants of Host Range and Virulence in Mouse-Adapted Influenza A Virus . 2010;84(20):10606–18.
97. Narasaraju T, Sim MK, Ng HH, Phoon MC, Shanker N, Lal SK, et al. Adaptation of human influenza H3N2 virus in a mouse pneumonitis model: insights into viral virulence, tissue tropism and host pathogenesis. *Microbes Infect.* 2009;11(1):2–11.
98. Medeiros R, Escriou N, Naffakh N, Manuguerra J, Werf S Van Der. Hemagglutinin Residues of Recent Human A (H3N2) Influenza Viruses That Contribute to the Inability to Agglutinate Chicken Erythrocytes. 2001;85:74–85.
99. Lin YP, Xionga X, Whartona SA, Martinc SR, Coombs PJ, Vachieri SG, et al.

Hemagglutinin Residues of Recent Human A(H3N2) Influenza Viruses That Contribute to the Inability to Agglutinate Chicken Erythrocytes. PNAS. 2013;109(52):21474–9.

100. Sauer A-K, Liang C-H, Stech J, Peeters B, Quere P, Schwegmann-Christel W, et al. Characterization of the Sialic Acid Binding Activity of Influenza A Viruses Using Soluble Variants of the H7 and H9 Hemagglutinins. PLoS One. 2014;9(2):1–9.
101. Sieben C, Kappel C, Zhu R, Wozniak A, Rankl C, Hinterdorfer P, et al. Influenza virus binds its host cell using multiple dynamic interactions. Proc Natl Acad Sci U S A. 2012;109(34):13626–31.
102. Monraz S. Niveles basales de carga viral cuantitativa y su asociación con la severidad de la enfermedad respiratoria de pacientes hospitalizados con el diagnóstico de neumonía por Influenza AH1N1pdm09. [TESIS DE POSGRADO]. Universidad Nacional Autónoma de México; 2015.
103. Marriott AC, Dimmock NJ. Defective interfering viruses and their potential as antiviral agents. Rev Med Virol. 2010;20(1):51–62.
104. Petrie SM, Guarnaccia T, Laurie KL, Hurt AC, McVernon J, McCaw JM. Reducing Uncertainty in Within-Host Parameter Estimates of Influenza Infection by Measuring Both Infectious and Total Viral Load. PLoS One. 2013;8(5).