



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA
PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

LOCALIZACIÓN DE VIRUS DE INFLUENZA MEDIANTE
INMUNOHISTOQUÍMICA Y MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN
EN CERDOS CALOSTRADOS Y NO CALOSTRADOS INOCULADOS CON 2
CEPAS DE VIRUS DE INFLUENZA H1N1

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

PRESENTA

MIREYA JUÁREZ RAMÍREZ

TUTOR PRINCIPAL:

FRANCISCO JOSÉ TRIGO TAVERA, FMVZ-UNAM

COMITÉ TUTORAL:

MARÍA ELENA TRUJILLO ORTEGA, FMVZ-UNAM

SUSANA MENDOZA ELVIRA, FESC-UNAM



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.

DEDICATORIA

**A mi familia
Gracias por su amor y apoyo**

AGRADECIMIENTOS

A los doctores Francisco Trigo, María Elena Trujillo, Susana Mendoza, Iván Sánchez y Laura Romero por su confianza, comentarios, enseñanzas, paciencia y apoyo invaluable. Son un gran ejemplo a seguir. Mil gracias.

A Miguel Ángel Martínez Ramírez por su apoyo en el procesamiento de las muestras para inmunohistoquímica.

A la Dra. Rosalba Carreón Napóles e Inocente Lara Cid por su apoyo en el procesamiento de las muestras para qRT-PCR.

Al Dr. Fernando García de la Unidad de Microscopia Electrónica del Instituto de Fisiología Celular por su apoyo en el uso y manejo del microscopio electrónico.

RESUMEN

La influenza es una enfermedad respiratoria de gran importancia en la salud pública y animal. El objetivo de este trabajo fue demostrar la presencia de la nucleoproteína (NP) de *Alfainfluenzavirus*, o partículas virales en tejidos que no pertenecen al tracto respiratorio mediante el uso de inmunohistoquímica (IHQ), microscopía electrónica de transmisión (MET) y qRT-PCR. Por IHQ con el uso de un anticuerpo monoclonal anti-nucleoproteína isotipo IgG2a se detectó la presencia de nucleoproteína en el núcleo y citoplasma del epitelio alveolar, macrófagos y células endoteliales del pulmón. En órganos linfoides se detectó en el núcleo y citoplasma de linfocitos, macrófagos, células endoteliales y células reticulares. En párpado, miocardio, hígado, riñón, vejiga urinaria, glándula salival, páncreas, oviducto, testículo y músculo esquelético la positividad a NP se detectó en el núcleo y citoplasma de macrófagos residentes y células endoteliales. En el estómago, intestino delgado y grueso la positividad a NP se detectó en el núcleo y citoplasma de linfocitos y macrófagos presentes en la lámina propia y submucosa, además del citoplasma de enterocitos de yeyuno y colon. Las muestras de encéfalo y médula espinal fueron negativas. El uso de MET permitió confirmar la presencia de partículas virales cuya morfología era compatible con *Influenzavirus* en neumocitos y células endoteliales del pulmón, macrófagos y células endoteliales del linfonodo y tonsila. En tejidos embebidos en parafina y procesados para MET no se lograron identificar partículas virales. Debido a esto se realizó qRT-PCR dirigida contra los genes NP y matriz (M) de los tejidos embebidos en parafina, se detectaron muestras positivas y sospechosas en tráquea y pulmón, órganos linfoides, hígado, riñón y vejiga urinaria, estómago e intestino, músculo cardíaco y esquelético. Aunque no se detectó NP o partículas virales en células residentes de los tejidos evaluados, la inmunopositividad en el núcleo y citoplasma de linfocitos, macrófagos, células reticulares y células endoteliales son indicativos de replicación viral activa.

Palabras clave: *influenzavirus*, inmunohistoquímica, microscopía electrónica, qRT-PCR, macrófagos y células endoteliales.

ABSTRACT

Influenza is a respiratory disease of great importance in public and animal health. The objective of this work was to demonstrate the presence of the nucleoprotein (NP) of *Alfainfluenzavirus*, or viral particles in tissues other than the respiratory through the use of immunohistochemistry (IHQ), transmission electron microscopy (MET) and qRT-PCR. The presence of nucleoprotein in the nucleus and cytoplasm of the alveolar epithelium, macrophages and endothelial cells of the lung was detected by IHQ with the use of an anti-nucleoprotein isotype IgG2a monoclonal antibody. In lymphoid organs it was detected in the nucleus and cytoplasm of lymphocytes, macrophages, endothelial cells and reticular cells. In the eyelid, myocardium, liver, kidney, urinary bladder, salivary gland, pancreas, oviduct, testis and skeletal muscle, NP positivity was detected in the nucleus and cytoplasm of resident macrophages and endothelial cells. In the stomach, small and large intestine, NP positivity was detected in the nucleus and cytoplasm of lymphocytes and macrophages present in the lamina propria and submucosa, in addition to the cytoplasm of jejunum and colon enterocytes. The brain and spinal cord samples were negative. The use of MET allowed to confirm the presence of viral particles whose morphology was compatible with *Influenzavirus* in pneumocytes and endothelial cells of the lung, macrophages and endothelial cells of the lymph node and tonsil. In tissues embedded in paraffin and processed for MET it was not possible to identify viral particles. qRT-PCR directed against the NP and matrix (M) genes of paraffin embedded tissues was performed, positive and suspect samples were detected in trachea and lung, lymphoid organs, liver, kidney and urinary bladder, stomach and intestine, cardiac and skeletal muscle. Although no NP or viral particles were detected in resident cells of the tissues evaluated, immunopositivity in the nucleus and cytoplasm of lymphocytes, macrophages, reticular cells and endothelial cells are indicative of active viral replication.

Keywords: influenzavirus, immunohistochemistry, electron microscopy, qRT-PCR, macrophages and endothelial cells.

CONTENIDO

Dedicatoria	I
Agradecimientos	II
Resumen	III
Abstract	IV
Contenido	V
Lista de cuadros	VI
Lista de figuras	VII
Abreviaturas	VIII
Capítulo I. Introducción, objetivos e hipótesis	1
Capítulo II. Revisión de literatura	4
Capítulo III. Material y métodos	15
Capítulo IV. Resultados	23
Capítulo V. Discusión	44
Conclusión y perspectivas	48
Referencias	49

LISTA DE CUADROS

	Página
Cuadro 1. Función y peso molecular de cada uno de los segmentos de los <i>Alfainfluenzavirus</i> .	7
Cuadro 2. Diseño experimental	18
Cuadro 3. Detección de nucleoproteína de <i>Alfainfluenzavirus</i> por inmunohistoquímica en tejidos de cerdos no calostrados y calostrados infectados con dos cepas de virus de influenza (pH1N1 y swH1N1).	25
Cuadro 4. Detección de nucleoproteína de <i>Alfainfluenzavirus</i> por inmunohistoquímica en cerdos no calostrados y calostrados infectados con dos cepas de virus de influenza (pH1N1 y swH1N1) en diferentes tejidos a los 2, 6 y 14 días postinoculación (DPI).	26
Cuadro 5. Detección de partículas de <i>Influenzavirus</i> por microscopía electrónica de transmisión en tejidos de cerdos no calostrados y calostrados infectados con dos cepas de virus de influenza (pH1N1 y swH1N1).	35
Cuadro 6. Detección de los genes matriz y nucleoproteína de <i>AlfaInfluenzavirus</i> por qRT-PCR en tejidos embebidos en parafina provenientes de cerdos no calostrados y calostrados infectados con dos cepas de virus de influenza (pH1N1 y swH1N1) a los 2, 6 y 14 días postinoculación (DPI).	41
Cuadro 7. Porcentaje de detección de muestras positivas a <i>Alfainfluenzavirus</i> por inmunohistoquímica, microscopía electrónica de transmisión y qRT-PCR en tejidos de cerdos no calostrados y calostrados infectados con dos cepas de virus de influenza (pH1N1 y swH1N1).	43

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Reconocimiento del virus de influenza de los sialiloligosacáridos presentes en la membrana citoplasmática de las células del aparato respiratorio.	8
Figura 2. Diagrama esquemático del ciclo de replicación del virus de influenza.	11
Figura 3. Células MDCK infectadas con virus pH1N1.	23
Figura 4. Pulmón de cerdo infectado con virus pH1N1.	24
Figura 5. Pulmón de cerdo no calostrado infectado con virus pH1N1, 2 días postinoculación (DPI). Inmunohistoquímica indirecta (IHQ)	27
Figura 6. Tonsila de cerdo calostrado infectado con virus pH1N1, 2 DPI. IHQ.	28
Figura 7. Timo de cerdo calostrado infectado con virus pH1N1, 2 DPI. IHQ.	29
Figura 8. Linfonodo de cerdo calostrado infectado con virus pH1N1, 2 DPI. IHQ.	29
Figura 9. Bazo de cerdo calostrado infectado con virus pH1N1, 2 DPI. IHQ.	30
Figura 10. Párpado de cerdo calostrado infectado con virus swH1N1, 2 DPI. IHQ.	31
Figura 11. Hígado de cerdo calostrado infectado con virus pH1N1, 6 DPI. IHQ.	31
Figura 12. Riñón de cerdo calostrado infectado con virus pH1N1, 6 DPI. IHQ.	32
Figura 13. Vejiga de cerdo calostrado infectado con virus swH1N1, 14 DPI. IHQ.	33
Figura 14. Estómago, yeyuno y colón de cerdo calostrado infectado con virus pH1N1, 6 DPI. IHQ.	34
Figura 15. Pulmón de cerdo no calostrado, inoculado con el virus swH1N1, 2 días postinoculación. MET. Contraste con acetato de uranilo y citrato de plomo.	36
Figura 16. Linfonodo de cerdo no calostrado, inoculado con el virus pH1N1, 2 días postinoculación. MET. Contraste con acetato de uranilo y citrato de plomo.	37
Figura 17. Linfonodo de cerdo no calostrado, inoculado con el virus pH1N1, 6 días postinoculación. MET. Contraste con acetato de uranilo y citrato de plomo.	38
Figura 18. Tonsila de cerdo no calostrado, inoculado con el virus pH1N1, 2 días postinoculación. MET. Contraste con acetato de uranilo y citrato de plomo.	39
Figura 19. Células MDCK infectadas con el virus pH1N1, 24 horas postinoculación. Contraste con acetato de uranilo y citrato de plomo.	41
Figura 20. Curva de amplificación de la qRT-PCR de <i>Alfainfluenzavirus</i> a partir de tejidos embebidos en parafina.	42

ABREVIATURAS

Cap-5'	Caperuza 5' o casquete
cRNA	Ácido ribonucleico complementario
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
HA	Hemaglutinina
HA1	Extremidad hidrófila de la HA
HA2	Extremidad hidrófoba de la HA
HRP	Peróxidasa de rábano
ICTV	International Committee on Taxonomy of Viruses
IgG2a	Inmunoglobulina isotipo G2a
M	Matriz
MDCK	Células epiteliales de riñón canino
MET	Microscopía electrónica de transmisión
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
NA	Neuraminidasa
NEP	Proteína de exportación nuclear
nm	Nanómetros
NP	Nucleoproteína
NS	Proteína no estructural
PA	Polimerasa ácida
PB1	Polimerasa básica 1
PB2	Polimerasa básica 2
PBS	Solución amortiguada de fosfatos
pH1N1	Virus de influenza pandémico H1N1
PRRS	Síndrome reproductivo y respiratorio porcino
RNA	Ácido ribonucleico
qRT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa en tiempo real
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa
RT-PCR anidada	Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa anidada
swH1N1	Virus de influenza porcina H1N1
TRIS	Trisaminometano
vRNA	Ácido ribonucleico viral
IHQ	Inmunohistoquímica
DPI	Días postinoculación

Capítulo I. Introducción, objetivos e hipótesis

1.1. Introducción

La cría de cerdos bajo condiciones intensivas ha favorecido la transmisión de agentes patógenos llevados por vía aerógena como: *Influenzavirus*, *Arterivirus*, *Circovirus porcino tipo 2*, *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Haemophilus parasuis*, *Streptococcus suis*, *Pasteurella multocida*, entre otros. Por consiguiente, los trastornos respiratorios y las enfermedades sistémicas de transmisión aérea se consideran actualmente los problemas sanitarios de mayor relevancia en la producción porcina moderna (Stärk, 2000; Brockmeier y col., 2002; Opriessnig y col., 2011).

La influenza es una enfermedad respiratoria de gran importancia en la salud pública y animal. La influenza porcina fue descrita por primera vez durante la pandemia de 1918, sin embargo el virus se aisló hasta 1931 (Shope, 1931; Schultz-Cherry y col., 2013). Los virus de influenza pertenecen a la familia *Orthomyxoviridae*, son virus envueltos y están compuestos por una cadena lineal de RNA en sentido negativo. De acuerdo con sus características genéticas y propiedades biológicas el International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) ha clasificado a esta familia en siete géneros: *Alfainfluenzavirus*, *Betainfluenzavirus*, *Gammainfluenzavirus*, *Deltainfluenzavirus*, *Isavirus*, *Togotavirus* y *Quaranjavirus* (ICVT, 2018).

Los virus de influenza que afectan a los cerdos pertenecen al género *Alfainfluenzavirus* y los subtipos que han logrado establecerse en poblaciones porcinas son H1N1, H1N2 y H3N2 (Olsen y col., 2006; Janke, 2014). La infección con virus del subtipo

H1N1 clásicos generalmente se limita al aparato respiratorio y se caracteriza por un comienzo súbito, tos, disnea, fiebre y postración, seguida por una rápida recuperación. Las lesiones se desarrollan con rapidez en el aparato respiratorio ocasionando neumonía broncointersticial y los esfuerzos destinados a demostrar replicación viral fuera del aparato respiratorio han sido infructuosos (Olsen y col., 2006; Brookes y col., 2009; Busquets y col., 2010). Los subtipos H1N2 y H3N2 además de ocasionar problemas respiratorios se han asociado con infertilidad, abortos, lechones nacidos muertos o débiles (Zhou, 2000; Karasin, 2002; Wesley, 2004).

Existen algunos estudios en donde se ha detectado la presencia de *Alfainfluenzavirus* en tejidos extrapulmonares mediante técnicas como inmunohistoquímica, RT-PCR, RT-PCR anidada y RT-PCR tiempo real (De Vleeschauwer y col., 2009; Fislova y col., 2009; Kulkarni y col., 2011; Papic y col., 2012).

La investigación realizada en esta tesis se ha centrado en demostrar la presencia de *Alfainfluenzavirus* en tejidos que no pertenecen al tracto respiratorio mediante el uso de inmunohistoquímica y microscopía electrónica de transmisión.

1.2. Objetivo general

Determinar la presencia del virus de influenza en tejidos que no pertenecen al tracto respiratorio en cerdos calostrados y no calostrados inoculados con dos cepas del virus de influenza subtipo H1N1 mediante el uso de inmunohistoquímica, microscopía electrónica de transmisión y qRT-PCR.

1.3. Objetivos específicos

Detectar la presencia de la nucleoproteína (NP) de *Alfainfluenzavirus* mediante inmunohistoquímica en tejidos que no pertenecen al tracto respiratorio en cerdos

calostrados y no calostrados inoculados con dos cepas del virus de influenza subtipo H1N1.

Identificar partículas virales cuya morfología sea compatible con virus de influenza mediante microscopía electrónica de transmisión (MET) en tejidos que no pertenecen al tracto respiratorio en cerdos calostrados y no calostrados inoculados con dos cepas del virus de influenza subtipo H1N1.

Detectar la presencia de la nucleoproteína (NP) y de la proteína matriz (M) de *Alfainfluenzavirus* mediante qRT-PCR en tejidos que no pertenecen al tracto respiratorio en cerdos calostrados y no calostrados inoculados con dos cepas del virus de influenza subtipo H1N1.

1.4. Hipótesis

Se detectará la presencia de la nucleoproteína de *Alfainfluenzavirus* mediante inmunohistoquímica en tejidos que no pertenecen al tracto respiratorio en cerdos calostrados y no calostrados inoculados con 2 cepas de virus de influenza subtipo H1N1.

Se identificarán partículas virales cuya morfología sea compatible con virus de influenza mediante microscopía electrónica de transmisión en tejidos que no pertenecen al tracto respiratorio en cerdos calostrados y no calostrados inoculados con 2 cepas de virus de influenza subtipo H1N1.

Capítulo II. Revisión de literatura

2.1. Características del virus de influenza.

Los virus de influenza pertenecen a la familia *Orthomyxoviridae* la cual comprende ocho géneros: *Alfainfluenzavirus*, *Betainfluenzavirus*, *Gammainfluenzavirus*, *Deltainfluenzavirus*, *Isavirus*, *Togotovirus* y *Quaranjavirus*. (ICTV, 2018). La especificidad del género o tipo de *Influenzavirus* está determinada por la naturaleza antigénica de la nucleoproteína (NP) y de la proteína matriz (M). Los *Alfainfluenzavirus* infectan una gran variedad de especies animales. Las aves acuáticas como patos y gansos se consideran los reservorios más importantes del virus. En el caso de los mamíferos las infecciones en humanos, cerdos y caballos se consideran de gran importancia. Las infecciones en perros domésticos, gatos domésticos, tigres, leopardos, mustélidos (hurón, garduña), mamíferos marinos (ballena, foca), camellos, ratas almizcleras, civetas, perros mapaches o tanukis, pika y osos hormigueros gigantes han sido descritos como hospedadores accidentales. (Zell, 2013). Los *Betainfluenzavirus* y *Gammainfluenzavirus* se encuentran típicamente solo en humanos, mientras que los *Deltainfluenzavirus* se han descrito en cerdos y bovinos (Shou y col., 2017).

Los *Alfainfluenzavirus* se clasifican en subtipos basados en la antigenicidad de sus moléculas de superficie: hemaglutinina (HA) (18 subtipos, de H1 a H18) y neuraminidasa (NA) (11 subtipos, de N1 a N11) (Maclachlan y Dubovi, 2011; Tong y col., 2012; Tong y col., 2013).

2.2. Morfología del virus de influenza

Los *Influenzavirus* son esféricos o pleomórficos, miden de 80-120 nm de diámetro. Algunas veces pueden adoptar formas filamentosas y medir hasta 400 nm. La superficie del virión exhibe proyecciones espaciadas de manera estrecha de 10-12 nm de longitud. Estas proyecciones con dos formas distintas son la hemaglutinina (HA) la cual es un trímero en forma de bastón, y la neuraminidasa (NA) que es un tetrámero en forma de hongo. Dentro de la envoltura viral está incluida la nucleoproteína (NP) la cual tiene simetría helicoidal (Cheville, 1994; Swayne y Halvorson, 2003; Olsen y col., 2006)

2.3. Estructura molecular del virus de influenza

Los virus de influenza presentan una envoltura derivada de la célula huésped. Es precisamente esta envoltura la que alberga la hemaglutinina (HA), la neuraminidasa (NA) y a la proteína matriz 2 (M2). La HA se encuentra en una proporción de 4-5 a 1 con respecto a la NA. La HA está constituida por 3 polipéptidos y cada polipéptido se procesa proteolíticamente en dos subunidades HA1 y HA2. Por la extremidad hidrófoba (HA2) se une a la capa lipídica de la envoltura y por su extremidad hidrófila (HA1) se fija a los receptores mucoproteínicos de los glóbulos rojos y de las células del epitelio respiratorio. Las HA son responsables de la hemaglutinación y de la fijación del virus a las células, primer paso para su penetración y replicación. La neuraminidasa (NA) está compuesta por una cabeza y un filamento, la cabeza está constituida por la asociación de cuatro glicopéptidos, que presentan actividad enzimática, pues al actuar sobre el ácido siálico (N-acetilneuramínico), principal componente de los receptores celulares, los destruye

produciendo un fenómeno de elusión o separación del virus de los glóbulos rojos y células infectadas. La proteína matriz 2 (M2) es un tetrámero en el que los monómeros están unidos por puentes disulfuro, estos monómeros forman un canal iónico el cual es activado a pH ácido y es fuertemente selectivo para protones. Por debajo de la envoltura viral está la principal proteína estructural, la proteína matriz 1 (M1) que rodea a las moléculas de RNA con relación a la nucleoproteína (NP) y tres proteínas grandes denominadas polimerasa básica 1 (PB1), polimerasa básica 2 (PB2) y polimerasa ácida (PA) que tienen como principal función la replicación y transcripción de RNA. El genoma de los virus de influenza es segmentado, en el caso de los *Alfainfluenzavirus* y *Betainfluenzavirus* está compuesto por 8 segmentos de RNA y en el caso de los *Gammmainfluenzavirus* y *Deltainfluenzavirus* por 7 segmentos de RNA. Estos segmentos están compuestos por RNA lineal, de una sola cadena de sentido negativo. En el caso de los *Alfainfluenzavirus* los 8 segmentos de RNA de algunas cepas pueden codificar hasta 19 proteínas debido a la presencia de varios marcos abiertos de lectura y a mRNAs que sufren splicing alternativo (Cuadro 1).

Cuadro 1. Función y peso molecular de cada uno de los segmentos de los *Alfainfluenzavirus*.

Segmento	Tamaño (nucleótidos)	Polipéptido	Función
1	2341	PB2	Polimerasa subunidad, reconocimiento de la cap en mRNA, iniciación de la transcripción.
		PB2-S1	Inhibe la vía de señalización de interferon dependiente de RIG-I.
2	2341	PB1	Polimerasa subunidad, enlongación de RNA, actividad de endonucleasa.
		PB1-F2	Actividad proapoptótica.
		PB1-N40	Interactúa con proteínas virales y de las células del hospedador durante el ciclo de replicación viral, su sobreexpresión está relacionada con mayor producción de vRNA.
3	2233	PA	Polimerasa subunidad, actividad de proteasa.
		PA-X	Participa en la replicación viral e inhibe la respuesta antiviral del hospedador.
		PA-N155	Promotor de la replicación viral.
		PA-N182	Promotor de la replicación viral.
4	1778	HA	Glicoproteína de superficie, principal antígeno en la respuesta inmune, unión al receptor celular y proteína de fusión.
5	1565	NP	Forma parte del complejo polimerasa, transporta el RNA viral del núcleo al citoplasma.
6	1413	NA	Glicoproteína de superficie, actividad de sialidasa, liberación del virus.
7	1027	M1	Proteína matriz, interacción con vRNP, regulación de la exportación nuclear del RNA.
		M2	Proteína integral de la membrana, canal iónico.
		M42	Funcionalmente similar a M2.
8	890	NS1	Proteína no estructural, tiene efecto inmunomodulador inhibiendo la producción de interferon tipo 1 (interferon α y β) en las células infectadas, regula la expresión génica del hospedero.
		NS2 o NEP	Proteína no estructural, exportación nuclear del RNA.
		NS3	Mejora la replicación viral. Adaptación a un nuevo hospedador.
		NEG8	Presente en influenzavirus humanos. Función desconocida.

(Heinen P, 2003; Swayne and Halvorson, 2003; Bouvier MN, 2008; Talledo M y Zumaeta K, 2009; Clifford y col., 2009; Selman y col., 2012; Wise y col., 2012; Hayashi y col., 2015; Yamayoshi y col., 2016; Wang y col., 2018; Wang y col., 2019)

2.4. Ciclo de replicación del virus de influenza

2.4.1. Adsorción y entrada

El virus llega a la mucosa del aparato respiratorio superior, en donde vence la acción defensiva del aparato mucociliar, una vez que logra llegar a la superficie de la célula epitelial, las hemagglutininas se unen a los sialiloligosacáridos presentes en la membrana, que en el caso del cerdo están constituidos por ácido siálico N acetil neuramínico unido a galactosa mediante un enlace α 2,6 en el epitelio traqueal y bronquial y por ácido siálico N acetil neuramínico unido a galactosa mediante un enlace α 2,3 en la lámina propia del tracto respiratorio (Flores y col., 2007; Nelli y col., 2010; Matrosovich y col., 2013) (Figura 1).

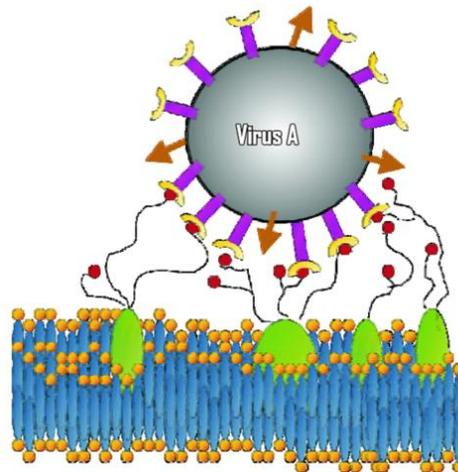


Figura 1. Reconocimiento del virus de influenza de los sialiloligosacáridos presentes en la membrana citoplasmática de las células del aparato respiratorio. (Flores y col., 2007)

La HA es procesada proteolíticamente en HA1 y HA2 mediante la acción de proteasas como la tripsina y el virus puede entrar a la célula mediante endocitosis mediada por clatrina (Figura 2), endocitosis independiente de clatrina, endocitosis independiente de

caveolina o macropinocitosis. Dentro del endosoma, la proteína M1 facilita la entrada de iones hidrógeno, lo que provoca una disminución del pH y favorece un cambio conformacional en la HA que induce la fusión de la envoltura viral con la membrana endocítica, este descenso de pH también activa el flujo de protones desde el endosoma al interior de la partícula viral, a través de los canales iónicos formados por la proteína M2. Su activación disminuye el pH en el interior de la partícula viral provocando la desestabilización de las interacciones entre los segmentos de RNA y la proteína M1 que los recubre liberándolos de esta manera en el citoplasma, para ser transportados al núcleo a través de los poros nucleares (Bouvier y Palese, 2008; Samji, 2009; Manjarrez y col., 2010; Resa-Infante y col., 2010; Salazar *et al.*, 2010; Pleschka, 2013; Dou y col., 2018).

2.4.2. Transcripción y replicación

Para iniciar la transcripción el virus de influenza requiere la participación de una RNA polimerasa II celular para la generación de RNAs mensajeros (mRNAs) con cap y un sitio de metilación. La PB2 reconoce y se une al cap metilado del extremo 5' del mRNA celular y lo corta a 10-15 nucleótidos de la cap, estos fragmentos son utilizados por la PB1 que cataliza la adición de nucleótidos durante la elongación del mRNA correspondiente a cada segmento del genoma viral. Durante este proceso se obtienen 2 tipos de RNA en sentido positivo: los mRNAs que dan origen a las proteínas virales y RNAs complementarios (cRNA) son utilizados para elaborar más copias de RNA viral (vRNA) en sentido negativo. Como se ha mencionado, cada segmento codifica para diferentes proteínas, dependiendo de la cepa de *Alfainfluenzavirus* (ver Tabla 1). Es importante señalar que durante la fase temprana de la infección el genoma viral se transcribe y replica

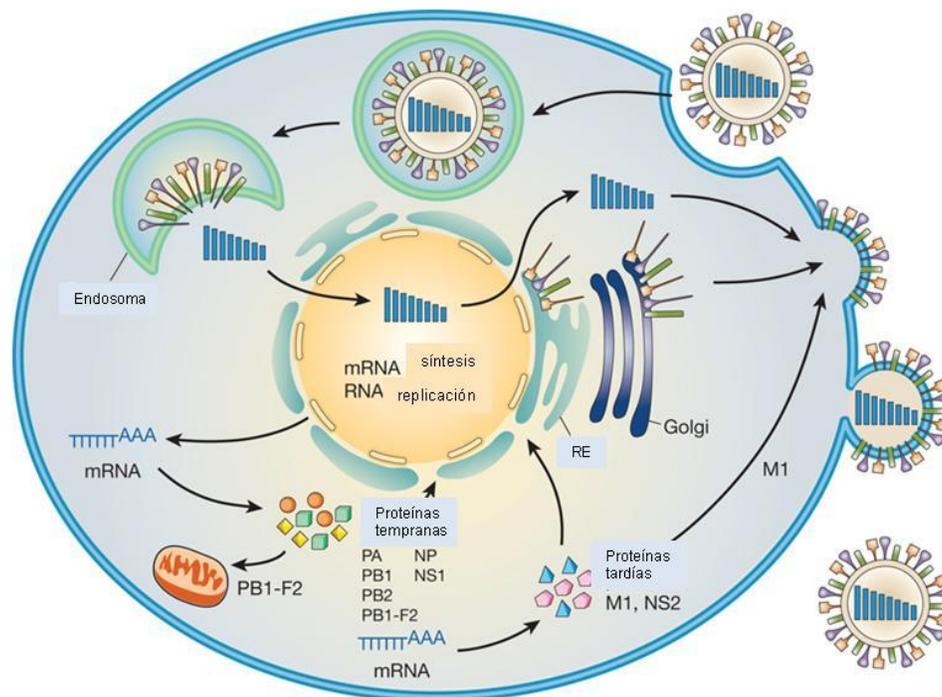
en una tasa muy elevada, mientras que en la fase tardía la transcripción disminuye y la replicación de los vRNA continua, el mecanismo de regulación de este proceso no se conoce con gran detalle, sin embargo en estudios *in vitro* se ha observado que la NP que no está asociada a los complejos ribonucleoproteína, al igual que la proteína M1 pueden tener un papel regulador al acumularse en grandes cantidades inhibiendo el proceso de transcripción (Bouvier y Palese, 2008; Samji, 2009; Manjarrez y col., 2010; Resa-Infante y col., 2010; Salazar *et al.*, 2010; Pleschka, 2013; Dou y col., 2018).

2.4.3. Ensamblaje y liberación

La HA y NA son glucosiladas en el retículo endoplásmico rugoso, modificadas en el aparato de Golgi y transportadas junto con la M2 mediante vesículas hacia la porción apical de las células donde son embebidas en la membrana celular. Un requerimiento importante para la HA es su corte mediante proteasas de la célula huésped a HA1 y HA2, que permanecen unidas por puentes disulfuro; se requiere de dicho procesamiento para la producción de virus infeccioso. Asimismo, se requiere el empaquetamiento de los 8 diferentes segmentos de RNA viral, este proceso se realiza de manera selectiva lo que garantiza que todos los segmentos serán incorporados en la mayoría de las partículas virales. La proteína M1 juega un papel importante al interactuar con las proteínas HA, NA y M2 presentes en la membrana celular, iniciando el proceso de curvatura de la membrana celular, además sobre esta proteína se incorporan los segmentos de RNA viral. Después de la producción y ensamble de las proteínas virales y el RNA, las partículas virales constituidas salen de la célula por gemación a partir de la superficie apical de la célula, quedando envueltas por una bicapa lipídica procedente de la célula infectada. En esta etapa

la neuraminidasa viral contribuye a la salida de los viriones de la célula infectada al evitar su agregación y formación de grandes grumos de partículas debido a la afinidad que tiene la HA por el ácido siálico presente en la membrana (Bouvier y Palese, 2008; Samji, 2009; Manjarrez y col., 2010; Resa-Infante y col., 2010; Salazar *et al.*, 2010).

Figura 2. Diagrama del ciclo de replicación del virus de influenza. Después del ingreso del virus por endocitosis mediada por receptor, los segmentos de RNA son liberados en el citoplasma y transportados al núcleo a través de los poros nucleares, donde la replicación y transcripción se lleva a cabo. Los mRNAs son transportados al citoplasma para llevar a cabo la traducción de las proteínas tempranas necesarias para la replicación y transcripción las cuales son transportadas de regreso al núcleo. En el retículo endoplásmico rugoso la HA y NA son glucosiladas y modificadas en el aparato de Golgi. En la fase tardía de la infección las proteínas M1 y NS2 (NEP) facilitan la exportación de los nuevos segmentos de RNA viral del núcleo a la membrana celular donde se lleva a cabo el ensamblado de las partículas virales (Neumann *et al.*, 2009).



En el proceso de replicación viral algunas células mueren por efecto del virus o de la respuesta inmune celular; otras permiten varios ciclos replicativos, ya que durante la infección con algunas cepas de *Influenzavirus* la muerte celular puede ser por apoptosis y se

ha observado que en esas condiciones se puede mejorar la replicación y diseminación viral ya que este tipo de muerte celular limita la respuesta inmune proinflamatoria. (Atkin-Smith y col., 2018)

2.5. Influenza porcina

La influenza porcina es una enfermedad respiratoria aguda causada por un *Alfainfluenzavirus*, comienza de manera súbita y los animales afectados presentan tos, disnea, fiebre, postración y abortos en hembras gestantes (Zhou, 2000; Karasin, 2002; Wesley, 2004). El virus se disemina por vía aérea a través de aerosoles generados por tos o estornudos y por contacto directo. La vía de entrada es a través del tracto respiratorio y el período de incubación es de 24 a 72 horas. El virus comienza a excretarse 24 horas después de la infección y su excreción puede durar de 7-10 días. Las lesiones se desarrollan con rapidez en el aparato respiratorio ocasionando una neumonía broncointersticial, los lóbulos afectados son rojos y firmes al tacto, las áreas de lesión se encuentran claramente demarcadas por tejido pulmonar normal y su distribución es craneoventral. Los lóbulos adyacentes ocasionalmente están enfisematosos y pueden exhibir edema interlobular. En la luz de los bronquios puede observarse exudado seromucoso e hiperemia. Los linfonodos mediastínicos y bronquiales pueden observarse aumentados de tamaño y edematosos. La mucosa traqueal se observa algunas veces hiperémica y edematosa. El curso, naturaleza y magnitud de la enfermedad varían con la cepa del virus, la edad, estado inmune del cerdo y la interacción con otros agentes del complejo respiratorio porcino. (Olsen y col., 2006; Caswell y Williams, 2007; Schultz-Cherry y col, 2013).

La infección por el virus de influenza porcina generalmente se limita al aparato respiratorio, etapas de viremia han sido detectadas sólo en raras ocasiones. Se ha demostrado replicación del virus en la mucosa nasal, amígdalas, tráquea, linfonodos traqueobronquiales y pulmón, siendo este último el principal órgano blanco (Olsen *et al.*, 2006).

2.5. Inmunohistoquímica

La inmunohistoquímica es una técnica que permite detectar *in situ* diferentes tipos de antígenos con el uso de anticuerpos específicos y sistemas de detección enzimáticos. En la detección de influenza porcina se han utilizado anticuerpos dirigidos contra las proteínas NP y HA. La NP, es una proteína altamente conservada en los *Alfainfluenzavirus*, lo que permite identificar cualquier subtipo, sin importar la especie, la inmunopositividad se observa en el núcleo y citoplasma de las células infectadas. La HA es una proteína específica de subtipo, lo que puede limitar su utilidad diagnóstica, la inmunopositividad se observa en el citoplasma y membrana celular de las células infectadas. Actualmente existen diferentes métodos de detección entre estos se encuentran los métodos de polímeros en donde el anticuerpo secundario está unido a un complejo de polímero de dextrano y moléculas de peroxidasa lo que incrementa su sensibilidad. En infecciones naturales y experimentales la inmunopositividad a la proteínas NP y HA de *Alfainfluenzavirus* se ha detectado en tráquea, pulmón, tonsila y linfonodo, en células epiteliales ciliadas, neumocitos y macrófagos (Vincent y col, 1997; Richt y col, 2006; Guarner y col, 2007; Buchwalow y col, 2010, Janke, 2013).

2.6. Ultraestructura

Los cambios ultraestructurales en células epiteliales alveolares infectadas con virus de influenza durante la fase de síntesis proteínica consisten en incremento de la densidad del nucléolo, seguido de dispersión del mismo y desarrollo de discretos agregados granulares a lo largo del núcleo. En el citoplasma pueden observarse agregados fibrilares o bien densos entramados proteínicos que están rodeados por ribosomas, las mitocondrias, el retículo endoplásmico y el aparato de Golgi pueden estar dilatados. El ensamblado de las partículas virales se lleva a cabo en la membrana celular y la liberación de estas es por gemación, debido a esto la membrana puede exhibir diferentes grados de alteración. El espacio intersticial puede estar distendido debido a la presencia de edema y fibrina, las células intersticiales y fibroblastos pueden exhibir una mayor cantidad de retículo endoplásmico. En el septo y espacio alveolar pueden observarse células polimorfonucleares, macrófagos, restos celulares y agregados de plaquetas asociadas a sitios de degeneración y desprendimiento endotelial (Winkler and Cheville, 1986; Cheville, 1994).

Capítulo III. Material y métodos

3.1. Estandarización de la técnica de inmunocitoquímica y validación del anticuerpo anti-nucleoproteína de *Alfainfluenzavirus* (AA5H)

Con el objetivo de estandarizar la técnica y validar la especificidad del anticuerpo anti-nucleoproteína de Abcam (AA5H, ab20343, isotipo IgG2a), se cultivaron dos cajas de células epiteliales de riñón canino Madin-Darby (MDCK) hasta obtener una confluencia del 80%, una de ellas se infectó con virus de influenza humana A/México/La Gloria-3/2009/H1N1 (GenBank: CY077595), 24 horas postinfección ambas cajas fueron tratadas con tripsina al 0.25% para separar las células de la placa, se realizaron 3 lavados con PBS, las células se fijaron en una mezcla de acetona(1):metanol(1) y se elaboraron botones celulares en laminillas electrocargadas, los cuales se fijaron y permeabilizaron en un mezcla de alcohol metílico y acetona (1:1) por 10 minutos y fueron conservados en congelación hasta que fueron utilizados.

Para la inmunocitoquímica se inactivo la peroxidasa endógena mediante la inmersión de las laminillas en una solución alcohol:peróxido a una proporción 1:8 durante 30 minutos a temperatura ambiente. Con el objetivo de disminuir la tinción de fondo debida a la presencia de interacciones hidrofóbicas entre macromoléculas, las laminillas fueron incubadas durante 30 min a 37°C con una solución de leche desengrasada (Svelty) al 0.5%. El anticuerpo primario se preparó a una dilución 1:800 (Anticuerpo monoclonal anti-nucleoproteína de Abcam (AA5H) ab20343) y se dejó incubar durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente se realizó la incubación con el anticuerpo secundario (Anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado con un polímero marcado con peroxidasa de rábano (Sistema Envision

FLEX-HRP) durante 20 minutos a temperatura ambiente. Para el revelado se utilizó diaminobencidina (DAB) y la contratinción se realizó con hematoxilina. La solución de lavado que se utilizó durante toda la prueba fue una solución amortiguada de fosfatos (PBS).

3.1.1. Controles para inmunocitoquímica

Control positivo: cultivo de células MDCK infectado con virus de influenza e incubadas con el anticuerpo primario.

Control negativo: cultivo de células MDCK no infectadas e incubadas con PBS.

Adicionalmente se prepararon botones celulares de células MDCK infectadas con virus de influenza las cuales se incubaron con PBS y células no infectadas incubadas con el anticuerpo primario.

3.2. Estandarización de la técnica de inmunohistoquímica y validación del anticuerpo anti-nucleoproteína de *Alfainfluenzavirus* (AA5H)

Se realizaron cortes de 3 micrómetros de grosor de pulmones de cerdo infectados con virus de influenza humana A/México/La Gloria-3/2009/H1N1 (GenBank: CY077595), pulmones de cerdo infectados con virus del Síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRS) y pulmones de cerdos sanos, los cuales fueron montados en laminillas electrocargadas. Posteriormente fueron desparafinados a 60°C durante una hora, colocados en Xilol por 5 minutos e hidratados con concentraciones decrecientes de alcohol del 100% hasta el 50%. Se realizó recuperación antigénica con calor y TRIS/EDTA a pH de 9 durante 3 minutos en horno de microondas a potencia 5, dentro de una olla de presión. Se inactivó

la peroxidasa endógena mediante la inmersión de las laminillas en una solución alcohol:peróxido a una proporción 1:8 durante 30 minutos a temperatura ambiente. Con el objetivo de disminuir la tinción de fondo debida a la presencia de interacciones hidrofóbicas entre macromoléculas, las laminillas fueron incubadas durante 30 min a 37°C con una solución de leche Svelty al 0.5%. El anticuerpo primario se preparó a una dilución 1:800 (Anticuerpo monoclonal anti-nucleoproteína de Abcam ((AA5H) ab20343) y se dejó incubar durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente se realizó la incubación con el anticuerpo secundario (Anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado con un polímero marcado con peroxidasa de rábano, Sistema Envision FLEX-HRP) durante 20 minutos a temperatura ambiente. Para el revelado se utilizó diaminobencidina (DAB) y la contratinción se realizó con hematoxilina. La solución de lavado que se utilizó durante toda la prueba fue una solución amortiguada de fosfatos (PBS).

3.2.1. Controles para inmunohistoquímica

Control positivo: pulmón de cerdo infectado con virus de influenza e incubado con el anticuerpo primario.

Control negativo: pulmón de cerdo sano incubado con PBS.

Adicionalmente se realizaron cortes histológicos de pulmón de cerdo infectado con el virus del Síndrome reproductivo y respiratorio del cerdo (PRRS) y se incubaron con el anticuerpo anti-nucleoproteína del virus de influenza y con PBS.

3.3. Inmunohistoquímica en tejidos de cerdos infectados con dos cepas de *Alfainfluenzavirus*

Se evaluaron tejidos porcinos embebidos en parafina obtenidos de una prueba previa en la que se inocularon intranasalmente 18 cerdos con una cepa de virus de influenza humana A/México/La Gloria-3/2009/H1N1 (GenBank: CY077595) y otros 18 con virus de influenza porcina A/swine/New Jersey/11/1976/H1N1 (GenBank:K00992), las dos cepas con un título viral de 1:64 UHA (unidades hemoaglutinantes) obtenido por hemaglutinación; $10^{6.9}$ copias de RNA/ μ l por qRT-PCR y con 1×10^3 DICC_{50%} para el virus pH1N1 y 1×10^1 DICC_{50%} para el virus swH1N1. Los tratamientos se describen en el cuadro 2:

Tratamiento	No. de animales
No calostrado/pH1N1*	9
Calostrado/pH1N1	9
Calostrado/swH1N1**	9
No calostrado/swH1N1	9

*Virus de influenza pandémico H1N1
** Virus de influenza porcino H1N1

Se realizaron cortes de 3 micrómetros de tráquea, pulmón, corazón, linfonodo, timo, tonsila, bazo, párpado, glándula salival, estómago, intestino delgado, intestino grueso, páncreas, hígado, riñón, vejiga urinaria, oviducto, testículo, encéfalo, médula espinal y músculo esquelético, los cuales fueron montados en laminillas electrocargadas. Los tejidos fueron procesados con la técnica previamente descrita en el apartado 3.2.

3.4. Microscopia electrónica de transmisión

3.4.1. Procesamiento de tejidos porcinos fijados en una mezcla de glutaraldehído 2.5% y paraformaldehído 4% para microscopia electrónica de transmisión

Para la evaluación ultraestructural se utilizaron fragmentos de pulmón, tonsila y linfonodos (submandibular, traqueobronquial, mesentérico e inguinal) los cuales fueron fijados en una mezcla de glutaraldehído 2.5% - paraformaldehído 4% durante 24 horas, después los tejidos fueron lavados con una solución de cacodilatos amortiguada a pH de 7.2, postfijados con tetraóxido de osmio al 1% y lavados con la solución amortiguada de cacodilatos. Posteriormente, fueron deshidratados con concentraciones ascendentes de acetona e incluidos en resinas epóxicas. Después, se realizaron cortes semifinos (200nm) los cuales se montaron en portaobjetos y contrastaron con azul de toluidina. Finalmente, se realizaron cortes finos de 60nm los cuales fueron montados en rejillas de cobre, contrastados con acetato de uranilo y citrato de plomo para su observación y evaluación en un microscopio electrónico JEOL JEM-1200 EX II. Se realizó la descripción de los cambios extra e intracelulares, se determinó la presencia o ausencia de partículas virales; así como, la morfología y tamaño de las mismas.

3.4.2. Procesamiento de tejidos porcinos embebidos en parafina para microscopia electrónica de transmisión

Se procesaron fragmentos de tráquea, corazón, timo, bazo, párpado, glándula salival, estómago, intestino delgado, intestino grueso, páncreas, hígado, riñón, vejiga urinaria, oviducto, testículo y músculo esquelético de tejidos que fueron positivos por

inmunohistoquímica a la nucleoproteína del virus de influenza y que estaban embebidos en parafina, para esto se obtuvieron fragmentos de 2-3 mm de tejido a partir de los bloques mediante el uso de una navaja, estos fragmentos fueron desparafinados con xilol absoluto e hidratados con concentraciones descendentes de acetona del 100% hasta el 50%, para ser fijados en una mezcla de glutaraldehído 2.5% - paraformaldehído 4%, después los tejidos fueron lavados con una solución de cacodilatos amortiguada a pH de 7.2, postfijados con tetraóxido de osmio al 1% y lavados con la solución amortiguada de cacodilatos. Posteriormente, fueron deshidratados con concentraciones ascendentes de acetona del 50% al 100% e incluidos en resinas epóxicas. Después, se realizaron cortes semifinos (200nm) los cuales se montaron en portaobjetos y contrastaron con azul de toluidina. Finalmente, se realizaron cortes finos de 60nm los cuales fueron montados en rejillas de cobre, contrastados con acetato de uranilo y citrato de plomo para su observación y evaluación en un microscopio electrónico JEOL JEM-1200 EX II.

3.4.3. Procesamiento de células MDCK infectadas con *Alfainfluenzavirus* para microscopia electrónica de transmisión

Las células fueron fijadas en una mezcla de glutaraldehído 2.5% - paraformaldehído 4% durante 24 horas, después fueron lavadas con una solución de cacodilatos amortiguada a pH de 7.2, postfijadas con tetraóxido de osmio al 1% y lavadas con la solución amortiguada de cacodilatos. Posteriormente, fueron deshidratadas con concentraciones ascendentes de acetona. Entre cada lavado y hasta llegar a la acetona absoluta las células fueron centrifugadas durante 10 minutos a 1500 rpm. Se realizó la inclusión en resinas epóxicas. Después, se realizaron cortes semifinos (200nm) los cuales se montaron en portaobjetos y

contrastaron con azul de toluidina. Finalmente, se realizaron cortes finos de 60nm los cuales fueron montados en rejillas de cobre, contrastados con acetato de uranilo y citrato de plomo para su observación y evaluación en un microscopio electrónico JEOL JEM-1200 EX II.

3.5. qRT-PCR

A partir de tejidos embebidos en parafina se realizaron cortes de 3 μ m, con el objetivo de obtener 9 cortes, los cuales se colocaron en microtubos para ser desparafinados y realizar la purificación del RNA total presente en los tejidos, para esto se utilizó la solución de desparafinación de Qiagen (No. Cat. 19093) y el Kit de purificación de RNA total para tejidos en parafina de la misma marca (No. Cat. 73504), el procedimiento se realizó siguiendo el protocolo del fabricante. Una vez extraído el RNA se realizó la cuantificación mediante espectofotometría en un Nanodrop ND-1000. El RNA viral se amplificó con el kit de detección VetMax™ Gold SIV (No. Cat. 4415200), con un volumen de master mix de 17 μ l y 8 μ l de RNA, las pruebas se realizaron en un termociclador Rotor Gene 6000 (Corbette Research, Australia) con las condiciones de transcripción reversa a 48°C durante 10 minutos, seguida de una inactivación de transcriptasa reversa y desnaturalización inicial a 95°C durante 10 minutos y finalmente la amplificación 40 ciclos 95°C durante 15 segundos y a 55°C durante 45 segundos. La adquisición y análisis de los datos se realizó utilizando el software del equipo Rotor Gene Q series 2.1.0. En cada corrida se utilizaron controles positivos y negativos para Influenza A, así como el control de extracción. Las muestras con un valor de Ct <38 fueron consideradas como positivas.

3.6. Análisis de resultados

Los datos obtenidos por inmunohistoquímica, microscopia electrónica de transmisión y qRT-PCR son de naturaleza binomial y medidos en una escala nominal cualitativa con dos categorías mutuamente excluyentes: positivo y negativo.

Capítulo IV. Resultados

4.1. Estandarización de la técnica de inmunocitoquímica y validación del anticuerpo anti-nucleoproteína de *Alfainfluenzavirus* (AA5H)

En las células MDCK infectadas con virus de influenza humana A/México/La Gloria-3/2009/H1N1 se observó que con el uso del anticuerpo monoclonal anti-NP AA5H isotipo IgG2a, la inmunopositividad se encontró en el núcleo y citoplasma, mientras que las células no infectadas fueron inmunonegativas (Figura 3).

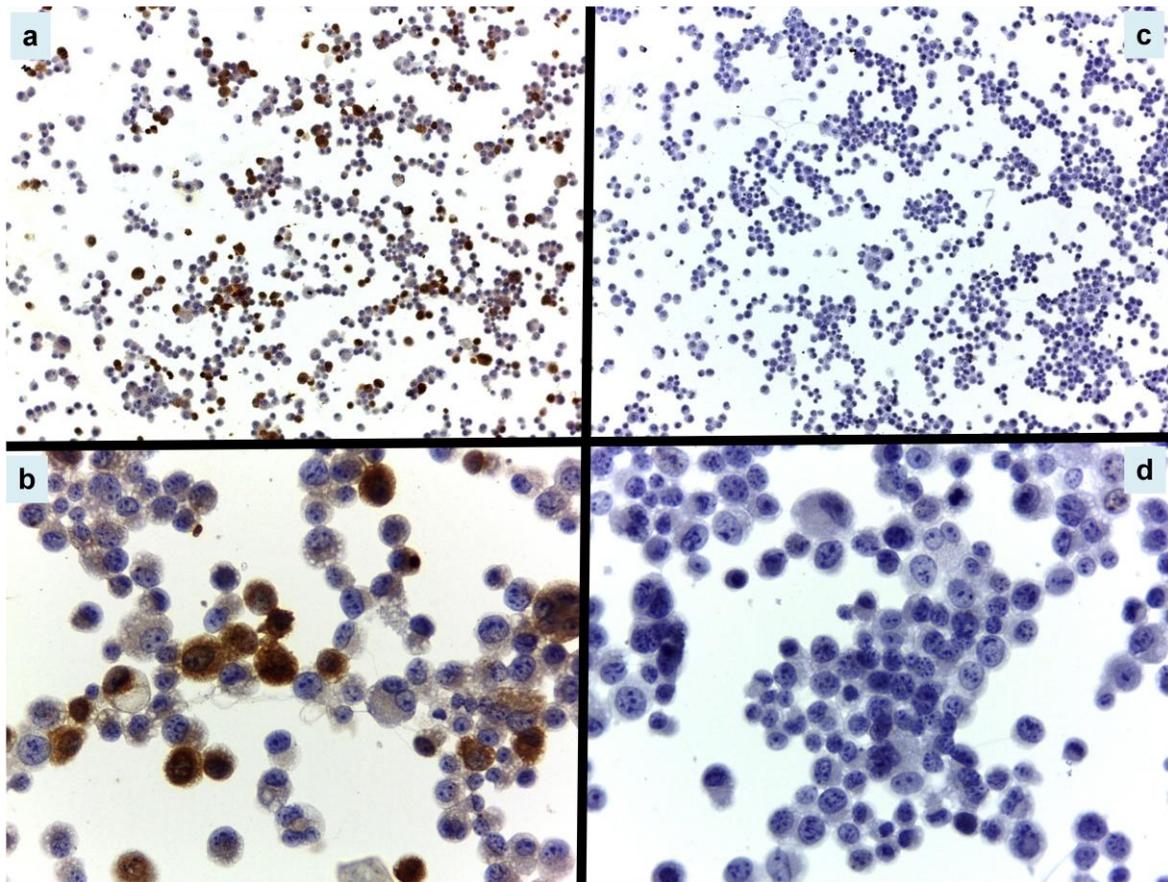


Figura 3. A y B. Células MDCK infectadas con virus pH1N1. La inmunopositividad se aprecia en el núcleo y citoplasma 40x y 400x. C y D. Células MDCK no infectadas. El núcleo y citoplasma son negativos. 40x y 400x. Inmunohistoquímica indirecta con sistema de amplificación Envision FLEX-HRP, contraste con hematoxilina de Harris.

4.2. Estandarización de la técnica de inmunohistoquímica y validación del anticuerpo anti-nucleoproteína de *Alfainfluenzavirus* (AA5H)

En las secciones de pulmón de cerdos infectados con virus de influenza humana A/México/La Gloria-3/2009/H1N1 se observó que con el uso del anticuerpo monoclonal anti-NP AA5H isotipo IgG2a, la inmunopositividad se encontró en el núcleo y citoplasma de neumocitos, macrófagos y células endoteliales, mientras que los pulmones de los cerdos no infectados con virus de influenza, infectados con PRRS y a los que se les retiró el anticuerpo primario y fueron incubados con PBS fueron negativos. Estos resultados validan que el anticuerpo monoclonal anti-NP AA5H reconoce específicamente a la nucleoproteína de *Alfainfluenzavirus* y que el sistema de detección utilizado no se une de manera inespecífica (Figura 4).

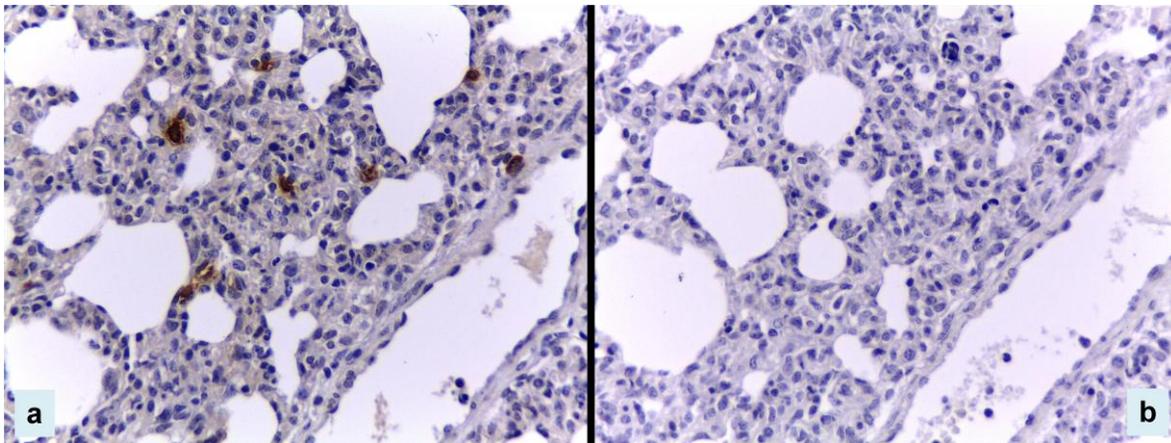


Figura 4. A. Pulmón de cerdo no calostrado infectado con virus pH1N1. La inmunopositividad se aprecia en el núcleo y citoplasma de los neumocitos. B. Pulmón de cerdo infectado con virus pH1N1. Se retiró el anticuerpo primario. El núcleo y citoplasma de neumocitos en el mismo campo son negativos. Inmunohistoquímica indirecta con sistema de amplificación Envision FLEX-HRP. Contraste con hematoxilina de Harris. 400x.

4.3. Inmunohistoquímica en tejidos de cerdos no calostrados y calostrados infectados con dos cepas de *Alfainfluenzavirus*

Los resultados de la detección de nucleoproteína de *Alfainfluenzavirus* en secciones histológicas de tráquea, pulmón, corazón, linfonodo, timo, tonsila, bazo, párpado, glándula salival, estómago, intestino delgado, intestino grueso, páncreas, hígado, riñón, vejiga urinaria, oviducto, testículo, encéfalo, médula espinal y músculo esquelético, provenientes de cerdos no calostrados y calostrados infectados con dos cepas de virus de influenza se resumen en los cuadros 3 y 4.

Cuadro 3. Detección de nucleoproteína de *Alfainfluenzavirus* por inmunohistoquímica en tejidos de cerdos no calostrados y calostrados infectados con dos cepas de virus de influenza (pH1N1 y swH1N1)

Tejido	Tratamiento				Total
	No cal/pH1N1	Cal/pH1N1	Cal/swH1N1	No cal/swH1N1	
Tráquea	0/9	1/9	0/9	0/9	1/36 (2.7%)
Pulmón	9/9	9/9	9/9	9/9	36/36 (100%)
Corazón	4/9	9/9	2/9	6/9	21/36 (58.3%)
Linfonodo	9/9	9/9	8/9	9/9	35/36 (97.2%)
Timo	7/9	7/9	9/9	9/9	32/36 (88.8%)
Tonsila	7/9	9/9	6/9	9/9	31/36 (86.1%)
Bazo	9/9	7/9	6/9	7/9	29/36 (80.5%)
Párpado	9/9	9/9	9/9	9/9	36/36 (100%)
Glándula salival	7/9	8/9	8/9	7/9	30/36 (83.3%)
Estómago	9/9	8/9	8/9	9/9	34/36 (94.4%)
Intestino delgado	9/9	9/9	9/9	9/9	36/36 (100%)
Intestino grueso	8/9	9/9	6/9	8/9	31/36 (86.1%)
Páncreas	4/9	3/9	0/9	2/9	9/36 (25%)
Hígado	7/9	9/9	9/9	9/9	34/36 (94.4%)
Riñón	5/9	8/9	4/9	8/9	25/36 (69.4%)
Vejiga urinaria	5/9	8/9	7/9	9/9	29/36 (80.5%)
Oviducto	1/9	5/9	3/9	4/9	13/36 (36.1%)
Testículo	3/9	0/9	1/9	2/9	5/36 (13.8%)
Encéfalo	0/9	0/9	0/9	0/9	0/36 (0%)
Médula espinal	0/9	0/9	0/9	0/9	0/36 (0%)
Músculo esquelético	4/9	7/9	2/9	7/9	20/36 (55.5%)

Cuadro 4. Detección de nucleoproteína de *Alfainfluenzavirus* por inmunohistoquímica en cerdos no calostrados y calostrados infectados con dos cepas de virus de influenza (pH1N1 y swH1N1) en diferentes tejidos a los 2, 6 y 14 días postinoculación (DPI)

Tejido	Tratamiento											
	No cal/pH1N1			Cal/pH1N1			Cal/swH1N1			No cal/swH1N1		
	DPI			DPI			DPI			DPI		
	2	6	14	2	6	14	2	6	14	2	6	14
Tráquea	0/3	0/3	0/3	0/3	1/3 ^a	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
Pulmón	3/3 ^b	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3
Corazón	1/3 ^c	1/3	2/3	3/3	3/3	3/3	1/3	1/3	0/3	2/3	1/3	3/3
Linfonodo	3/3 ^d	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	2/3	3/3	3/3	3/3
Timo	2/3 ^d	2/3	3/3	2/3	2/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3
Tonsila	2/3 ^d	3/3	2/3	3/3	3/3	3/3	3/3	2/3	1/3	3/3	3/3	3/3
Bazo	3/3 ^d	3/3	3/3	2/3	2/3	3/3	3/3	2/3	1/3	2/3	2/3	3/3
Párpado	3/3 ^c	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3
Glándula salival	2/3 ^c	3/3	2/3	3/3	3/3	2/3	2/3	3/3	3/3	2/3	2/3	3/3
Estómago	3/3 ^e	3/3	3/3	3/3	3/3	2/3	3/3	3/3	2/3	3/3	3/3	3/3
Intestino delgado	3/3 ^e	3/3	3/3	3/3	3/3 ^f	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3
Intestino grueso	3/3 ^e	2/3	3/3	3/3	3/3 ^f	3/3	2/3	3/3	1/3	3/3	2/3	3/3
Páncreas	1/3 ^c	1/3	2/3	2/3	1/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	2/3	0/3
Hígado	1/3 ^c	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3
Riñón	0/3	2/3 ^c	3/3	3/3	2/3	3/3	2/3	1/3	1/3	3/3	3/3	2/3
Vejiga urinaria	0/3	3/3 ^c	2/3	2/3	3/3	3/3	3/3	1/3	3/3	3/3	3/3	3/3
Oviducto	0/3	0/3 ^c	1/3	1/3	2/3	2/3	1/3	1/3	1/3	1/3	1/3	2/3
Testículo	0/3	2/3 ^c	1/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	1/3	0/3	2/3	0/3
Encéfalo	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
Médula espinal	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
Músculo esquelético	0/3	2/3 ^c	2/3	3/3	2/3	2/3	1/3	0/3	1/3	2/3	2/3	3/3

^aInmunopositividad en cilios del epitelio traqueal

^bInmunopositividad en el epitelio alveolar, macrófagos y células endoteliales

^cInmunopositividad en macrófagos y células endoteliales

^dInmunopositividad en linfocitos, macrófagos, células reticulares y células endoteliales

^eInmunopositividad en linfocitos y macrófagos presentes en la lámina propia y submucosa

^fInmunopositividad en enterocitos

4.4. Distribución de la nucleoproteína de *Alfainfluenzavirus* en tejidos de cerdos no calostrados y calostrados infectados con dos cepas de *Alfainfluenzavirus*

Tráquea y pulmón: en el epitelio traqueal solo 1 de 36 muestras evaluadas fue positiva a nucleoproteína de *Alfainfluenzavirus* en el borde apical de células ciliadas. La muestra positiva se detectó a los 6 DPI en el grupo de cerdos calostrados e infectados con el virus pH1N1 (Cuadro 3 y 4). En el pulmón la inmunopositividad a nucleoproteína de *Alfainfluenzavirus* se detectó en el núcleo y citoplasma de células epiteliales alveolares (neumocitos tipo I y II), macrófagos alveolares y células endoteliales en el 100% (36/36) de las muestras evaluadas. (Cuadro 3 y 4) (Figura 5).

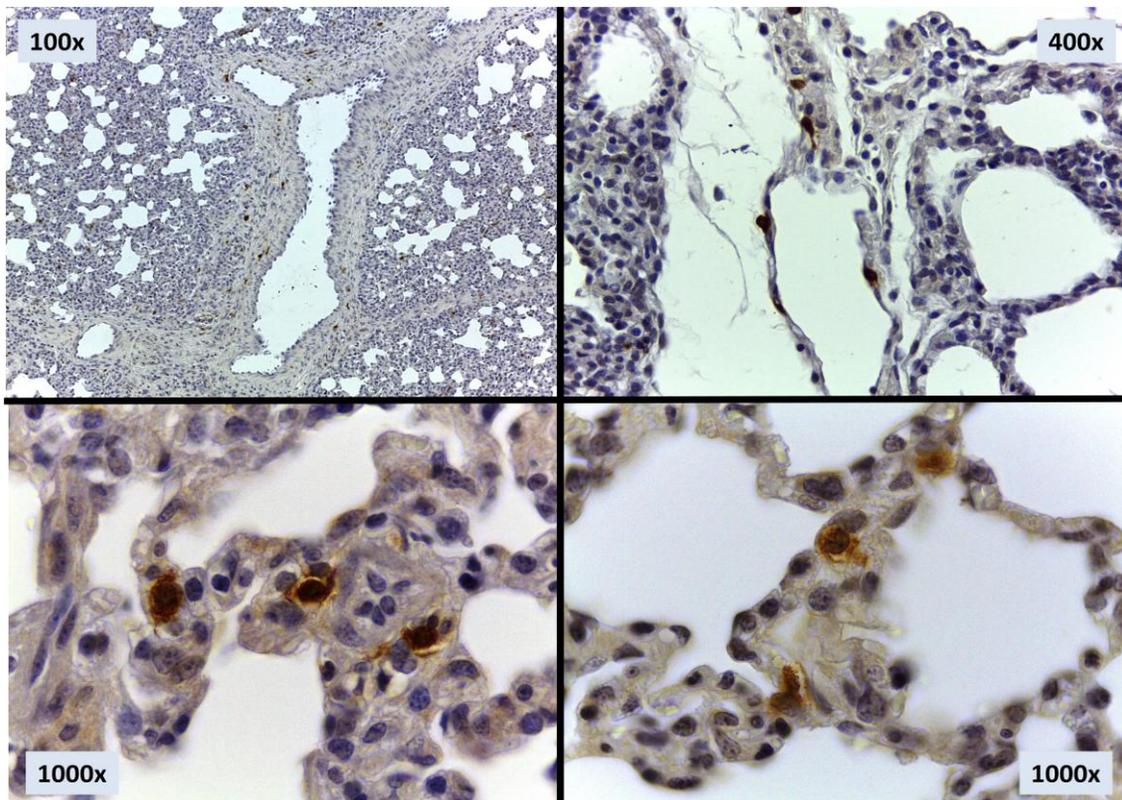


Figura 5. Pulmón de cerdo no calostrado infectado con virus pH1N1, 2 días postinoculación (DPI). La inmunopositividad se aprecia en el núcleo y citoplasma de neumocitos, macrófagos alveolares y células endoteliales de vasos linfáticos de septos interlobulillares. Inmunohistoquímica indirecta con sistema de amplificación Envision FLEX-HRP.

Órganos linfoides: en tonsila, timo, linfonodos y bazo la nucleoproteína de *Alfainfluenzavirus* se detectó en el núcleo y citoplasma de linfocitos, macrófagos, células reticulares y células endoteliales (Cuadro 3 y 4) (Figuras 6-9).

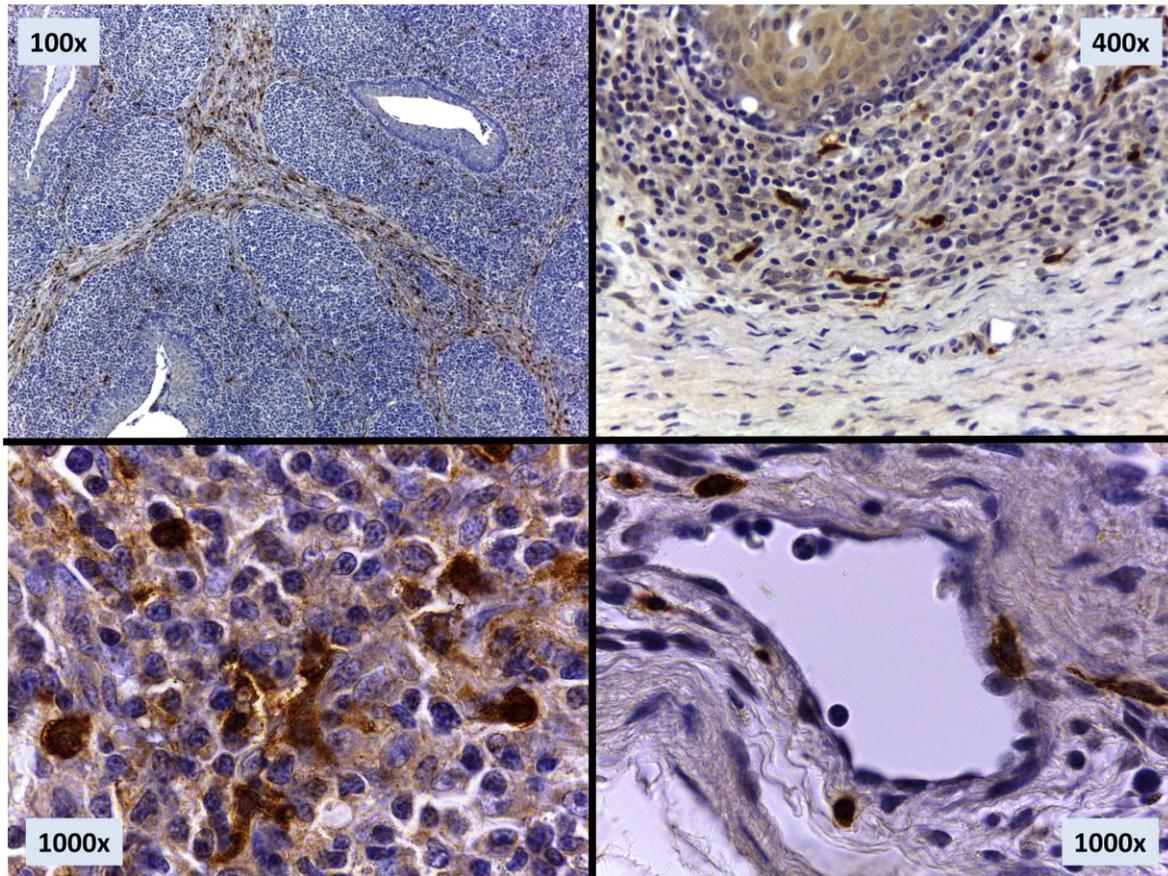


Figura 6. Tonsila de cerdo calostrado infectado con virus pH1N1, 2 DPI. La inmunopositividad se aprecia en el núcleo y citoplasma de linfocitos, macrófagos, células reticulares y células endoteliales. Inmunohistoquímica indirecta con sistema de amplificación Envision FLEX-HRP. Contraste con hematoxilina de Harris.

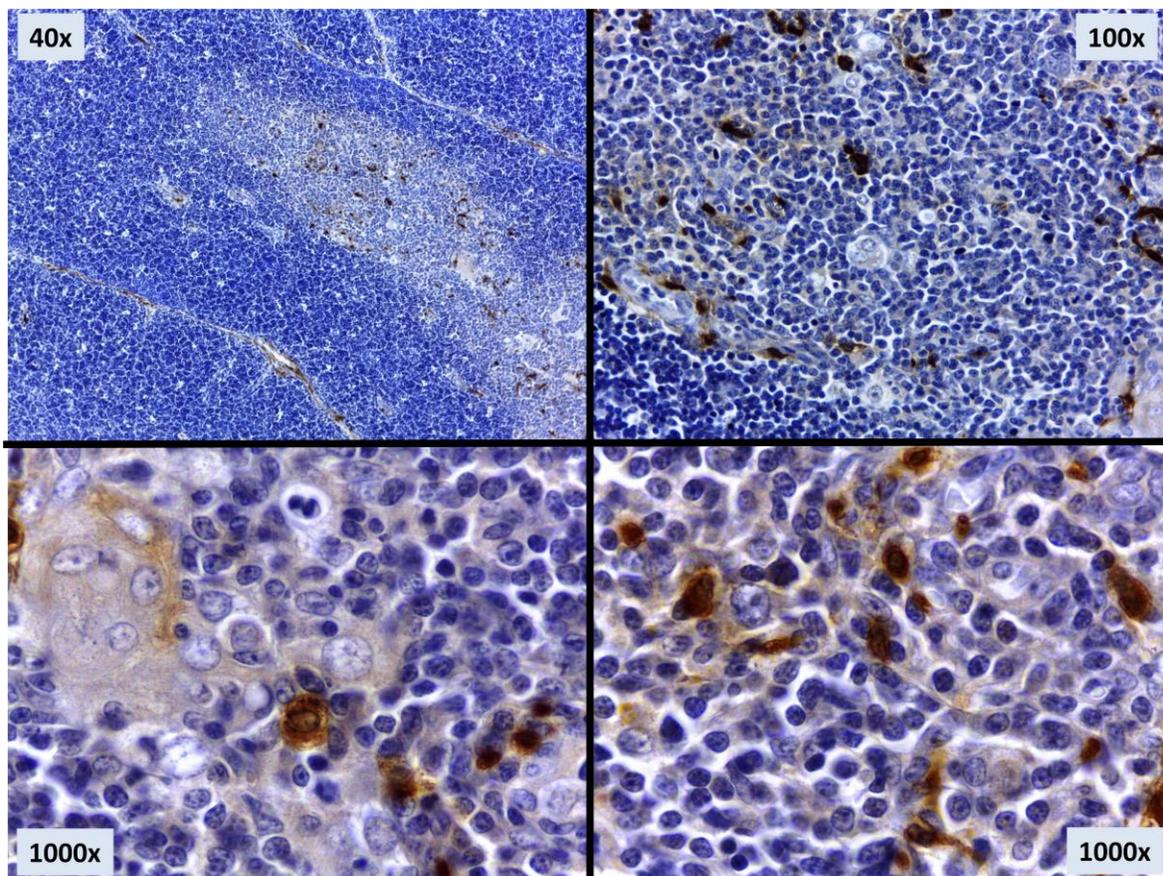


Figura 7. Timo de cerdo calostrado infectado con virus pH1N1, 2 DPI. La inmunopositividad se aprecia en el núcleo y citoplasma de linfocitos, células epiteliales reticulares y macrófagos. Inmunohistoquímica indirecta con sistema de amplificación Envision FLEX-HRP. Contraste con hematoxilina de Harris.

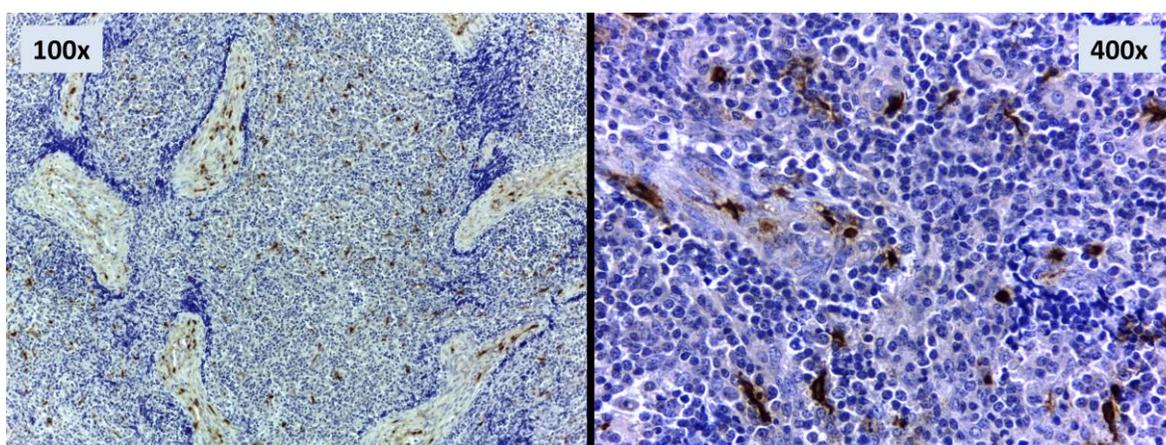


Figura 8. Linfonodo de cerdo calostrado infectado con virus pH1N1, 2 DPI. La inmunopositividad se aprecia en el núcleo y citoplasma de linfocitos, macrófagos y células reticulares. Inmunohistoquímica indirecta con sistema de amplificación Envision FLEX-HRP. Contraste con hematoxilina de Harris.

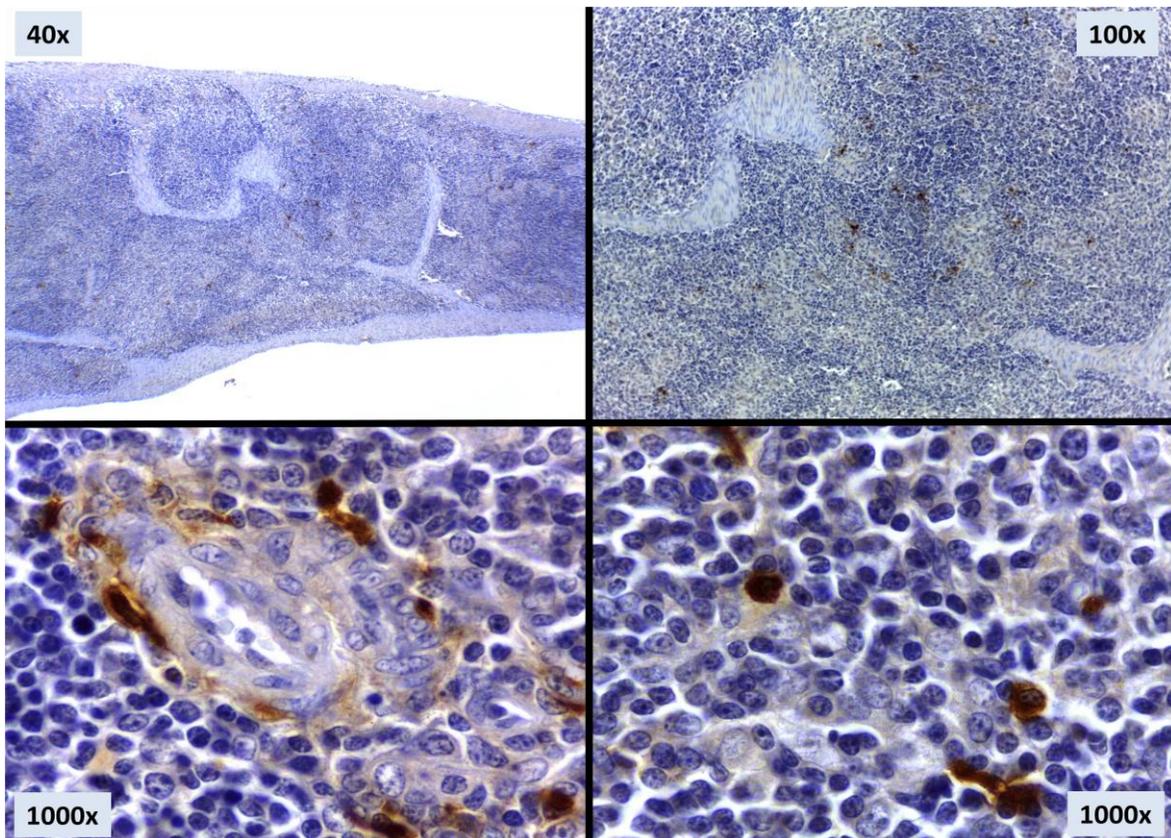


Figura 9. Bazo de cerdo calostrado infectado con virus pH1N1, 2 DPI. La inmunopositividad se aprecia en el núcleo y citoplasma de linfocitos, macrófagos y células reticulares. Inmunohistoquímica indirecta con sistema de amplificación Envision FLEX-HRP. Contraste con hematoxilina de Harris.

En tejidos como el párpado (Figura 10), miocardio, hígado (Figura 11), riñón (Figura 12), vejiga urinaria (Figura 13), glándula salival, páncreas, oviducto, testículo y músculo esquelético la inmunopositividad a la nucleoproteína de *Alfainfluenzavirus* se detectó en núcleo y citoplasma de macrófagos residentes y células endoteliales (Cuadro 3 y 4).

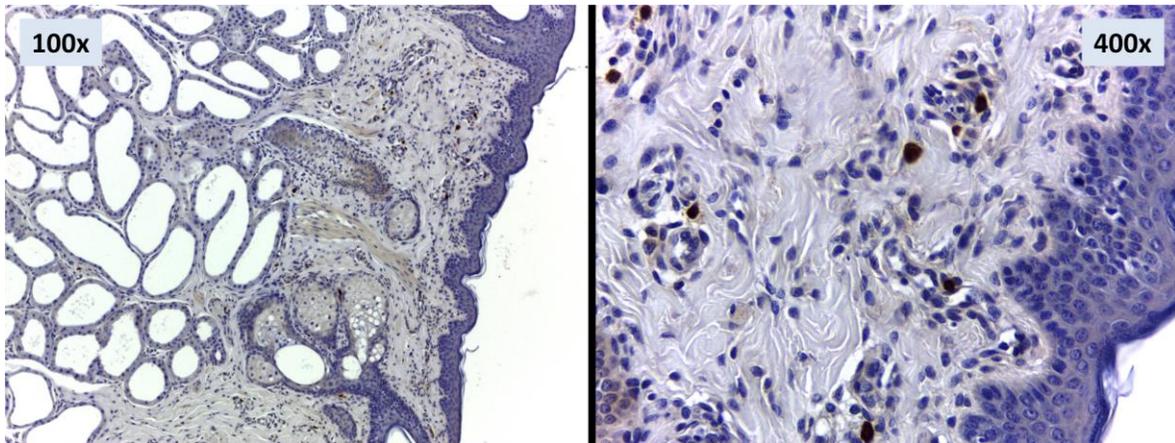


Figura 10. Párpado de cerdo calostrado infectado con virus swH1N1, 2 DPI. La inmunopositividad se aprecia en el núcleo y citoplasma de macrófagos. Inmunohistoquímica indirecta con sistema de amplificación Envision FLEX-HRP. Contraste con hematoxilina de Harris.

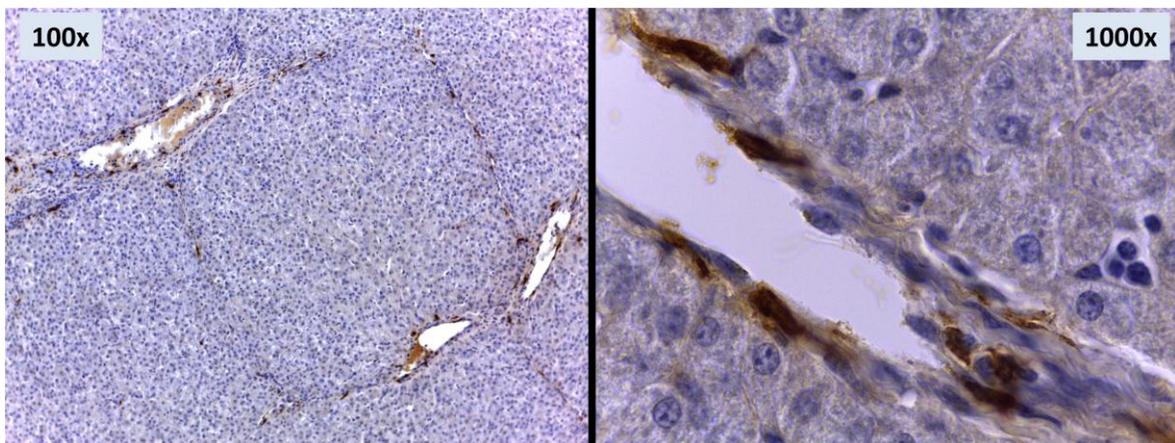


Figura 11. Hígado de cerdo calostrado infectado con virus pH1N1, 6 DPI. La inmunopositividad se aprecia en el núcleo y citoplasma de las células de Kupffer y endoteliales. Inmunohistoquímica indirecta con sistema de amplificación Envision FLEX-HRP. Contraste con hematoxilina de Harris.

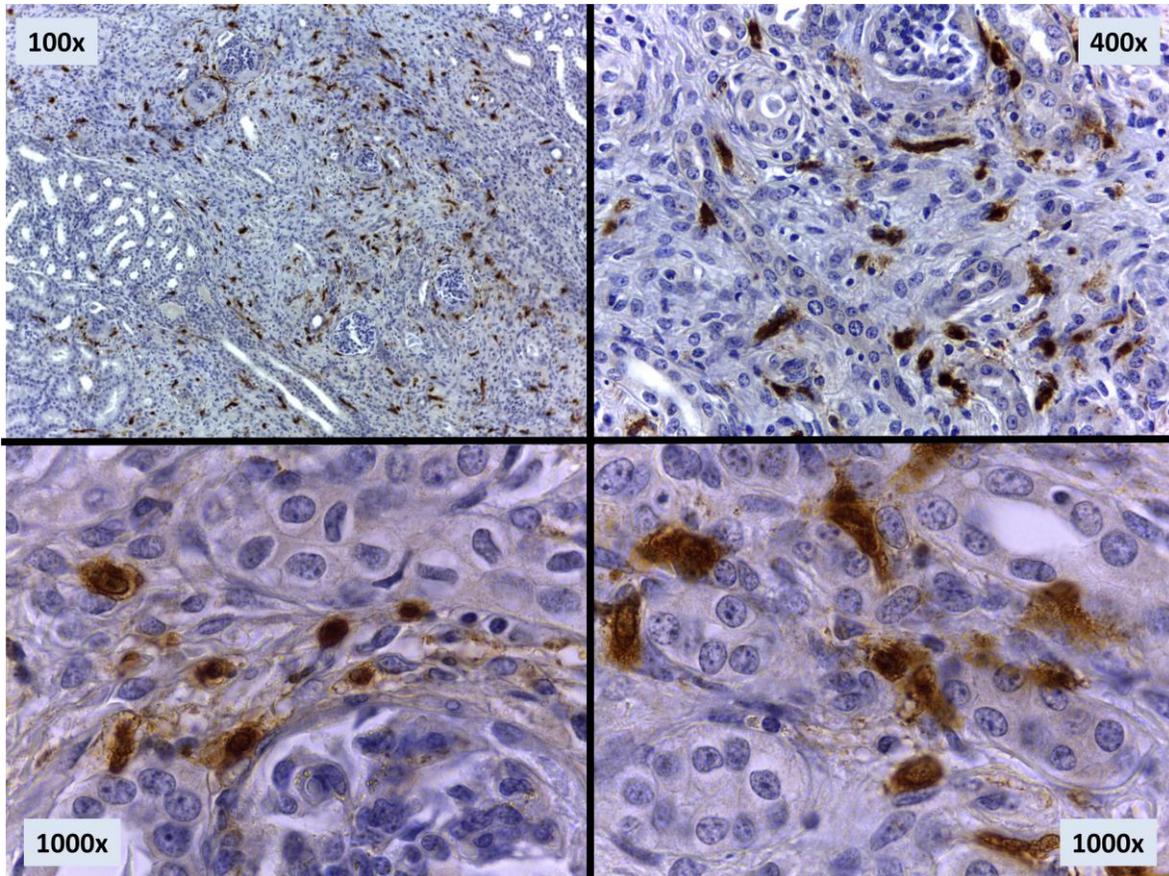


Figura 12. Riñón de cerdo calostrado infectado con virus pH1N1, 6 DPI. La inmunopositividad se aprecia en el núcleo y citoplasma de macrófagos y células endoteliales de vasos sanguíneos intersticiales. Inmunohistoquímica indirecta con sistema de amplificación Envision FLEX-HRP. Contraste con hematoxilina de Harris.

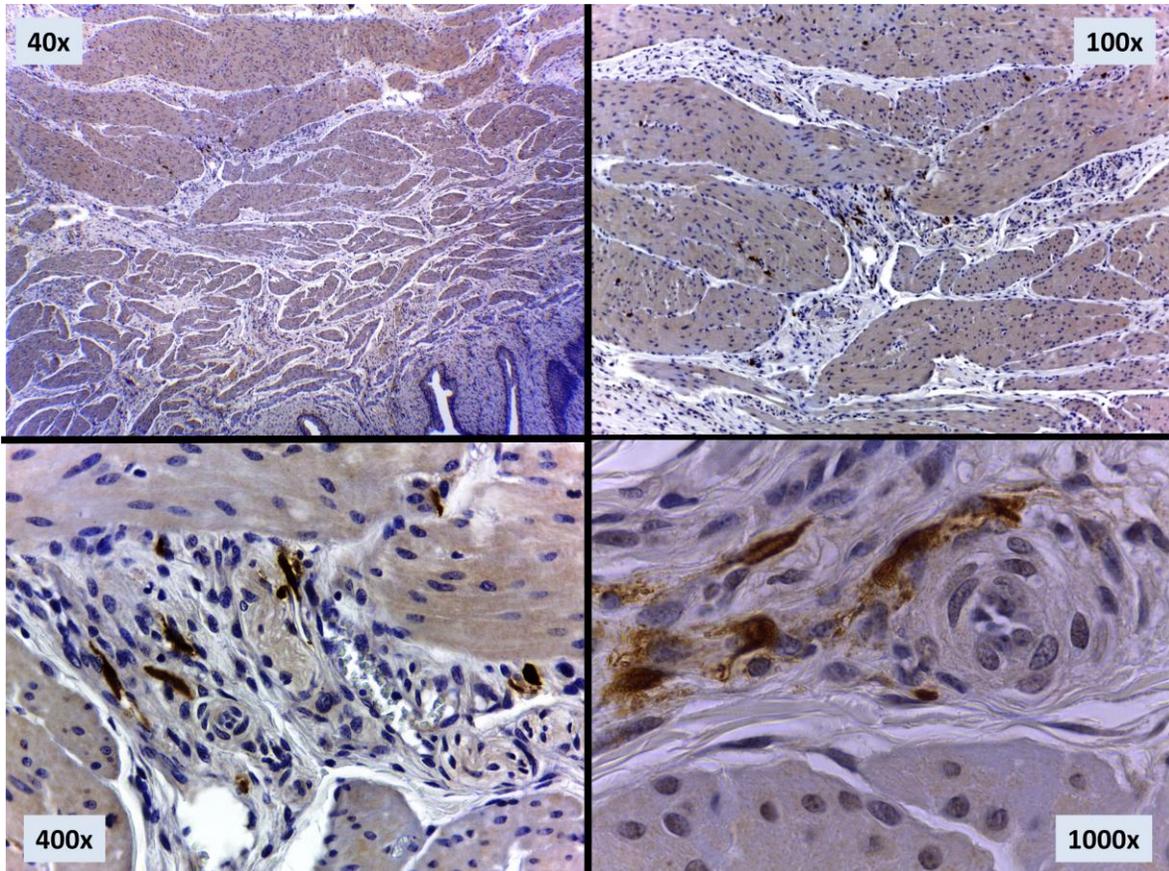


Figura 13. Vejiga de cerdo calostrado infectado con virus swH1N1, 14 DPI. La inmunoposividad se aprecia en el núcleo y citoplasma de macrófagos presentes alrededor de vasos sanguíneos de la capa muscular. Inmunohistoquímica indirecta con sistema de amplificación Envision FLEX-HRP. Contraste con hematoxilina de Harris.

En el estómago, intestino delgado y grueso la nucleoproteína de *Alfainfluenzavirus* se detectó en el núcleo y citoplasma de linfocitos y macrófagos presentes en la lámina propia y submucosa. En una de las secciones de yeyuno y colón del grupo calostrado e infectado con el virus pH1N1 a los 6 DPI la nucleoproteína de *Alfainfluenzavirus* se detectó en el citoplasma de los enterocitos (Cuadro 3 y 4) (Figura 14).

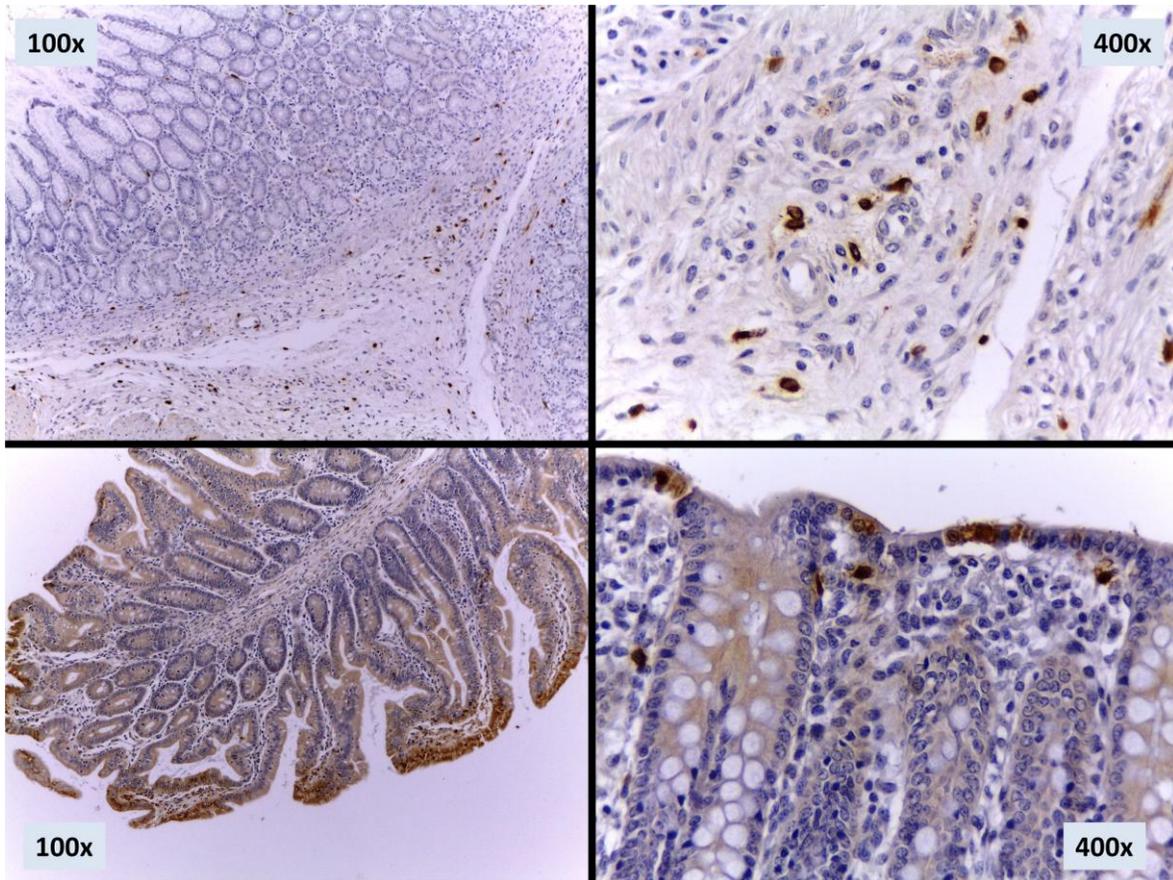


Figura 14. Estómago, yeyuno y colón de cerdo calostrado infectado con virus pH1N1, 6 DPI. La inmunopositividad se aprecia en el núcleo y citoplasma de macrófagos presentes en la lámina propia y submucosa, además de enterocitos del yeyuno y colón. Inmunohistoquímica indirecta con sistema de amplificación Envision FLEX-HRP. Contraste con hematoxilina de Harris.

Las muestras de encéfalo y médula espinal fueron negativas a la nucleoproteína de *Alfainfluenzavirus* (Cuadro 3 y 4).

No se observó efecto de la cepa, del calostro o de los días postinfección sobre la positividad observada en los tejidos. Es importante señalar que solo en el pulmón, órganos linfoides y en el yeyuno y colon de uno de los cerdos evaluados del grupo calostrado e infectado con el virus pH1N1 a los 6 DPI se observó inmunopositividad en células residentes.

4.5. Microscopía electrónica de transmisión de tejidos porcinos fijados en una mezcla de glutaraldehído 2.5% y paraformaldehído 4%

Los resultados de la detección de partículas virales compatibles con *Influenzavirus* en fragmentos de pulmón, linfonodo y tonsila que fueron fijados en una mezcla de glutaraldehído 2.5% y paraformaldehído 4% se resumen en el cuadro 5.

Cuadro 5. Detección de partículas de *Influenzavirus* por microscopía electrónica de transmisión en tejidos de cerdos no calostrados y calostrados infectados con dos cepas de virus de influenza (pH1N1 y swH1N1)

Tejido	Tratamiento				Total
	No cal/pH1N1	Cal/pH1N1	Cal/swH1N1	No cal/swH1N1	
Tráquea	0/9	0/9	0/9	0/9	0/36 (0%)
Pulmón	9/9	9/9	9/9	9/9	36/36 (100%)
Linfonodo	9/9	9/9	8/9	9/9	35/36 (97.2%)
Tonsila	7/9	9/9	6/9	9/9	31/36 (86.1%)

4.6. Distribución de las partículas virales de *Alfainfluenzavirus* en tejidos de cerdos no calostrados y calostrados infectados con dos cepas de *Alfainfluenzavirus*

Pulmón: en el citoplasma de células epiteliales alveolares (neumocitos tipo I), se observaron abundantes partículas virales cuyos diámetros oscilaban entre 90-360nm, estas partículas virales eran esféricas y en algunos casos pleomórficas, se encontraban envueltas por una membrana electrodensa sobre la cual se observaban numerosas proyecciones que correspondían a las glicoproteínas de superficie HA y NA. Dichas partículas estaban adyacentes al aparato de Golgi, el cual estaba ligeramente hinchado; asimismo, se observaron numerosos ribosomas libres y material electrodensito fibrilar. En otros campos,

estas partículas virales se observaron emergiendo de células epiteliales alveolares (neumocitos tipo I); así como, dentro de prominentes vacuolas que se localizaban en el espacio intersticial entre la membrana basal de las células epiteliales alveolares (neumocitos tipo I) y la membrana basal de las células endoteliales, estas vacuolas contenían abundante material electrodensito fibrilar, en ocasiones agregados de ribosomas y entremezcladas se observaron numerosas partículas virales como las antes descritas (Figura 15)

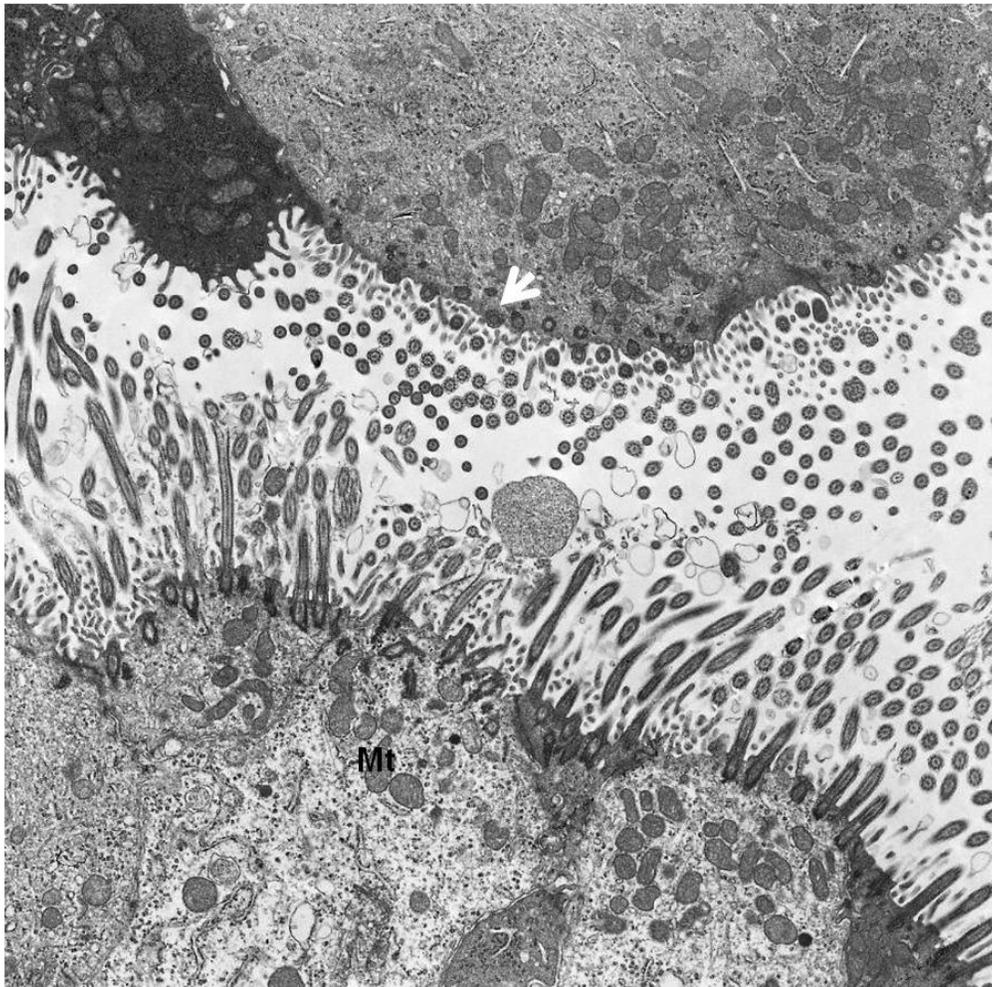


Figura 15. Pulmón de cerdo no calostrado, inoculado con el virus swH1N1, 2 días postinoculación. Emergiendo de células epiteliales alveolares se observan abundantes partículas virales (flecha) MET. Contraste con acetato de uranilo y citrato de plomo 4,400x.

Linfonodo: en el citoplasma de macrófagos se observaron abundantes partículas virales cuyos diámetros oscilaban entre 90-360nm, estas partículas virales eran esféricas, se encontraban envueltas por una membrana electrodensa sobre la cual se observaban numerosas proyecciones que correspondían a las glicoproteínas de superficie HA y NA (Figura 16 y 17).

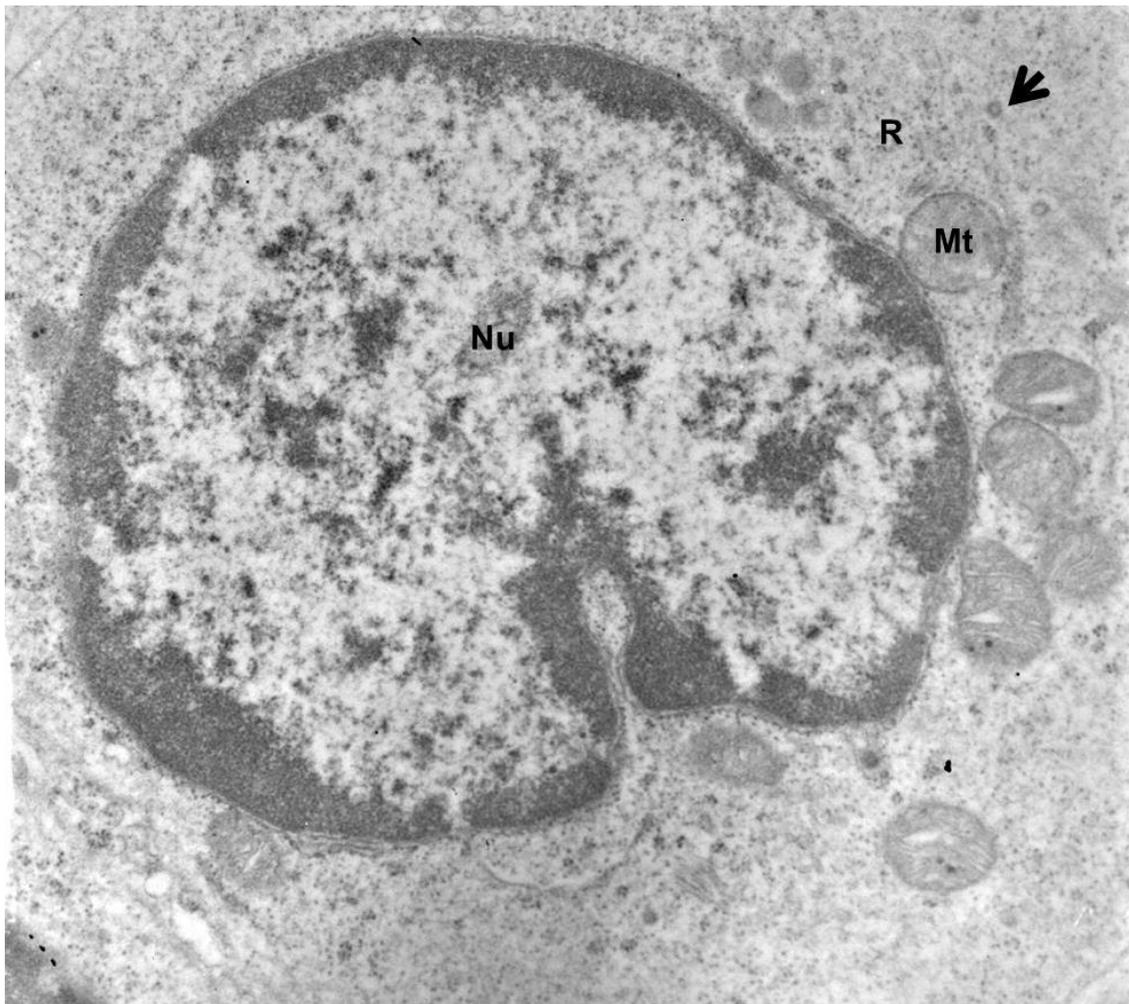


Figura 16. Linfonodo de cerdo no calostrado, inoculado con el virus pH1N1, 2 días postinoculación. En el citoplasma de un macrófago se observan escasas partículas virales (flecha) entremezcladas con ribosomas (R) libres y escaso material proteínico electrodensio fibrilar. MET. Contraste con acetato de uranilo y citrato de plomo 12,000x.

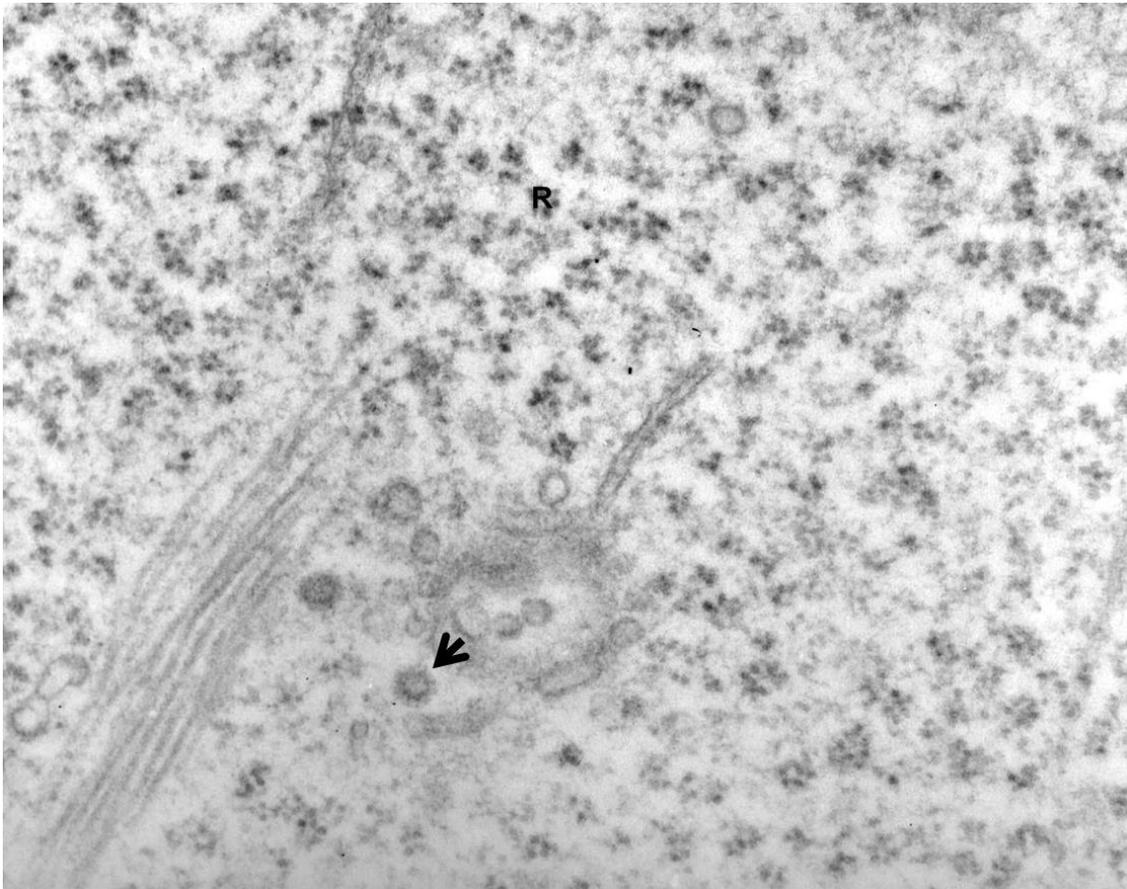


Figura 17. Linfonodo de cerdo no calostrado, inoculado con el virus pH1N1, 6 días postinoculación. En el citoplasma de un macrófago se observan escasas partículas virales (flecha) entremezcladas con ribosomas (R) libres y escaso material proteínico electrodenso fibrilar. MET. Contraste con acetato de uranilo y citrato de plomo 20,000x.

Tonsila: en el citoplasma de células endoteliales se observaron escasas partículas virales cuyos diámetros oscilaban entre 90-360nm, estas partículas virales eran esféricas, se encontraban envueltas por una membrana electrodenso sobre la cual se observaban numerosas proyecciones que correspondían a las glicoproteínas de superficie HA y NA (Figuras 18).

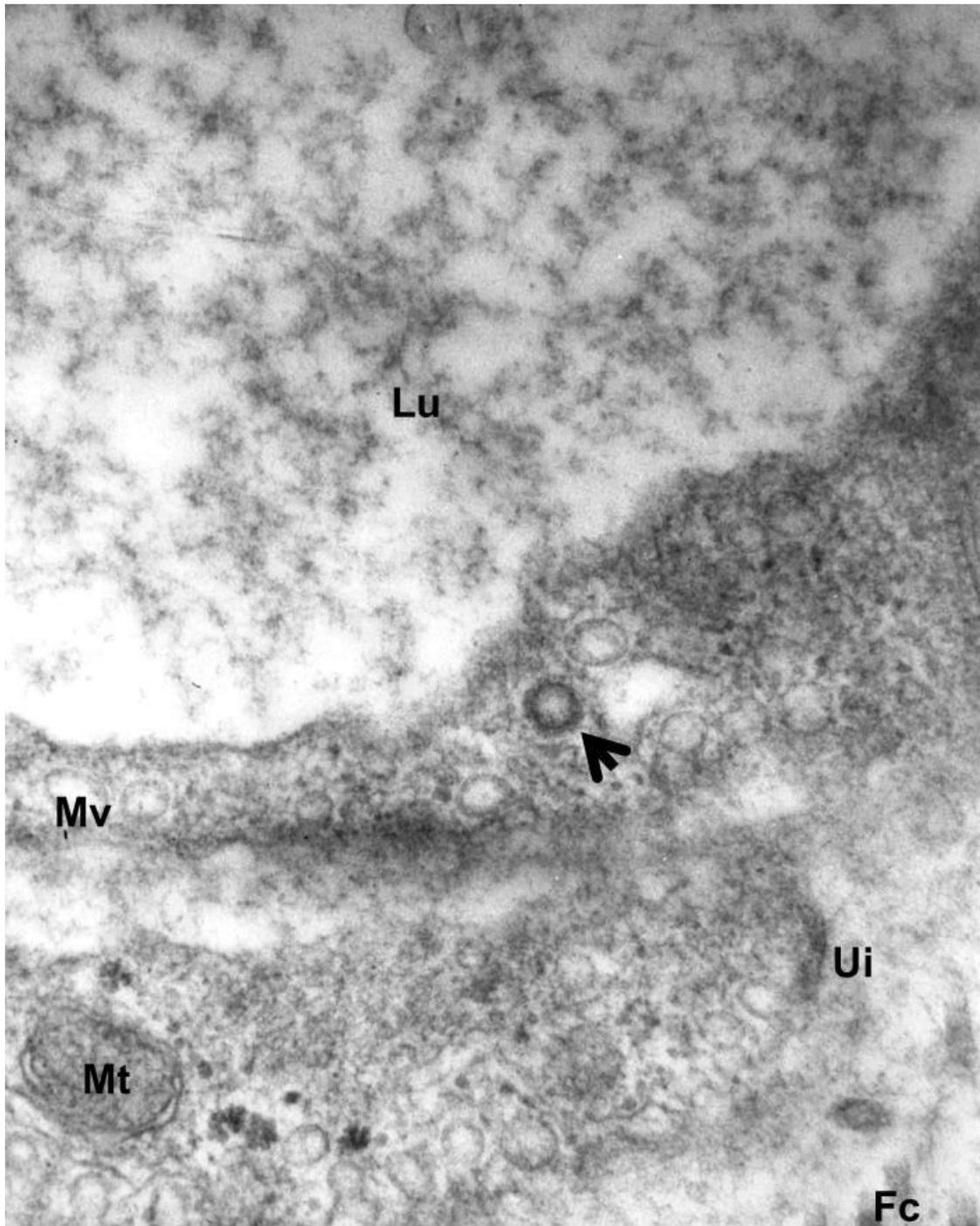


Figura 18. Tonsila de cerdo no calostrado, inoculado con el virus pH1N1, 2 días postinoculación. En la prolongación citoplasmática de una célula endotelial se observa una partícula viral (flecha) cercana al lumen vascular (Lu), adyacente a esta hay microvesículas (Mv), mitocondrias (Mt), uniones intercelulares (Ui) y fibras de colágeno. MET. Contraste con acetato de uranilo y citrato de plomo 30,000x.

4.7. Microscopia electrónica de transmisión de tejidos porcinos embebidos en parafina

En los fragmentos de tráquea, corazón, timo, bazo, párpado, glándula salival, estómago, intestino delgado, intestino grueso, páncreas, hígado, riñón, vejiga urinaria, oviducto, testículo y músculo esquelético de tejidos que fueron positivos por inmunohistoquímica a la nucleoproteína del virus de influenza que estaban embebidos en parafina, no se identificaron partículas virales cuya morfología fuera compatible con *Influenzavirus*.

4.8. Microscopia electrónica de transmisión de células MDCK infectadas con *Influenzavirus*

Las células MDCK infectadas con el virus pH1N1 y procesadas 24 horas postinfección exhibieron cambios degenerativos y necróticos severos y en las escasas células que quedaron viables se observaron escasas partículas virales que emergía de la membrana celular cuya morfología era consistente con *Influenzavirus* (Figura 19).



Figura 19. Células MDCK infectadas con el virus pH1N1, 24 horas posinfección. En la membrana celular se observan dos partículas virales (flecha) MET. Contraste con acetato de uranilo y citrato de plomo 6,000x.

4.9. Detección de RNA viral de *Influenzavirus* por qRT-PCR

Los resultados de la detección de RNA viral de *Influenzavirus* en tejidos embebidos en parafina se resumen en el cuadro 6.

Cuadro 6. Detección de los genes matriz y nucleoproteína de *Influenzavirus* por qRT-PCR en tejidos embebidos en parafina provenientes de cerdos no calostrados y calostrados infectados con dos cepas de virus de influenza (pH1N1 y swH1N1) a los 2, 6 y 14 días postinoculación (DPI)

Tejido	Tratamiento											
	No cal/pH1N1			Cal/pH1N1			Cal/swH1N1			No cal/swH1N1		
	DPI			DPI			DPI			DPI		
	2	6	14	2	6	14	2	6	14	2	6	14
Tráquea y pulmón	+	+	+	+	+	+	+	-	S	-	+	-
Órganos linfoides	+	+	-	S	+	-	+	-	+	-	+	-
Hígado, riñón y vejiga urinaria	S	-	-	-	-	-	-	S	-	-	S	S
Estómago e intestino	+	S	S	S	+	-	S	S	-	S	S	S
Encéfalo y médula espinal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Músculo cardíaco y esquelético	S	S	-	S	S	S	S	S	S	-	S	-

S= Sospechosa. Es una muestras con valor de Ct <33 pero cuya curva no era típica.

Con el uso de qRT-PCR de las 12 muestras evaluadas por tejido en tráquea y pulmón el 66.6% fueron positivas y el 8.3% sospechosas; de los órganos linfoides el 50% fueron positivas y el 8.3% sospechosas; el hígado, riñón y vejiga urinaria el 33.3% fueron sospechosas; en estómago e intestino el 16% fueron positivas y 66.6% fueron sospechosas; en el músculo cardíaco y esquelético el 75% fueron sospechosas y en el caso del encéfalo y la médula espinal fueron negativas (Cuadro 6 y Figura 20).

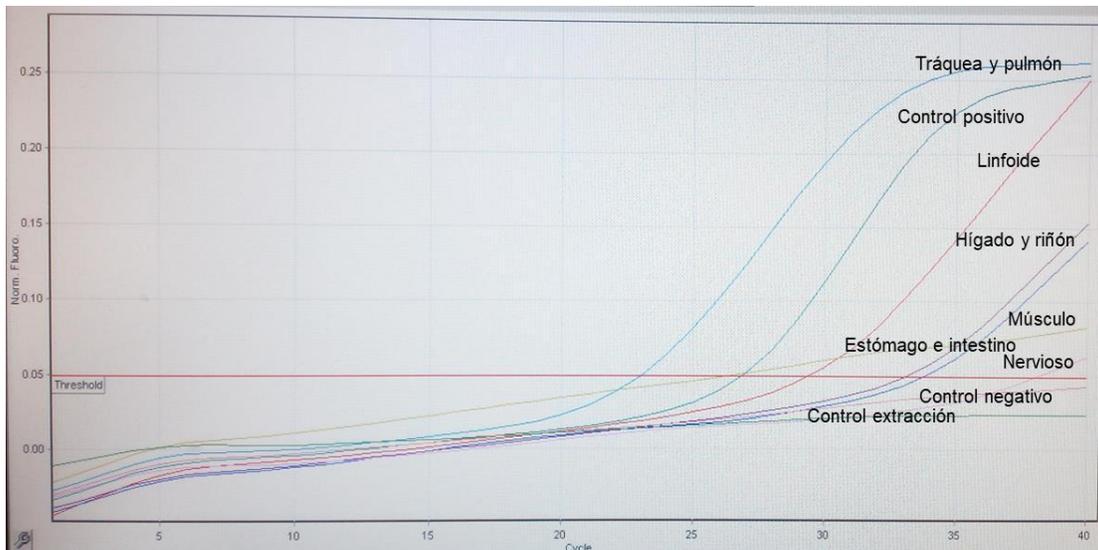


Figura 20. Curva de amplificación de la qRT-PCR de *Alfairinfluenzavirus* a partir de tejidos embebidos en parafina provenientes de cerdos no calostrados infectados con el virus pH1N1 a los 2 DPI.

4.10. Comparación entre técnicas diagnósticas

Por inmunohistoquímica y microscopía electrónica de transmisión se detectó la nucleoproteína y partículas virales cuya morfología era compatible con *Alfainfluenzavirus* en el 100% de las muestras de pulmón, linfonodo y tonsila evaluadas, mientras que por qRT-PCR el porcentaje de muestras positivas se encontró entre el 50% y 66%.

Cuadro 7. Porcentaje de detección de muestras positivas a *Alfainfluenzavirus* por inmunohistoquímica, microscopía electrónica de transmisión y qRT-PCR en tejidos de cerdos no calostrados y calostrados infectados con dos cepas de virus de influenza (pH1N1 y swH1N1)

Tejido	Inmunohistoquímica	Microscopía electrónica de transmisión	qRT-PCR
Respiratorio (pulmón)	100%	100%	66.6%
Linfoide (linfonodo y tonsila)	100%	100%	50%

Estos resultados consideran solo muestras que fueron positivas a la detección de nucleoproteína por inmunohistoquímica, partículas virales compatibles con *Alfainfluenzavirus* por microscopía electrónica de transmisión y detección de los genes M y NP por qRT-PCR

Capítulo V. Discusión

La inmunohistoquímica es una técnica que ha sido utilizada para la detección de *Influenzavirus* en cerdos infectados experimentalmente y en casos de campo de cerdos con enfermedad respiratoria, el antígeno ha sido detectado de forma primaria en el epitelio bronquial y bronquiolar, glándulas submucosas, neumocitos y células inflamatorias como macrófagos alveolares, tanto en el núcleo como en el citoplasma (Vincent y col, 1997). A diferencia de lo descrito en otros estudios (Haines y col, 1993; Vincent y col, 1997; Jung y col, 2002; Sreta y col 2009; Gill y col, 2010; Nakajima y col, 2012; Rajão y col, 2013), en el presente estudio el epitelio bronquial y bronquiolar fue inmunonegativo en los cuatro tratamientos evaluados. Sin embargo, la inmunopositividad a nucleoproteína se detectó en neumocitos, macrófagos alveolares, células endoteliales y tejido conectivo (fibroblastos), estos dos últimos tipos celulares al igual que macrófagos residentes fueron inmunopositivos en corazón, órganos linfoides (linfonodos, timo, tonsila, bazo, tejido linfoide asociado a tracto intestinal), párpado, glándula salival, estómago, intestino delgado y grueso, páncreas, hígado, riñón, vejiga urinaria, ovario, testículo y músculo esquelético. De acuerdo con lo descrito por Nelli y col, (2010) los tejidos del cerdo presentan una amplia distribución de receptores que contienen residuos terminales de ácido N-acetilneuramínico, lo que brinda una amplia gama de células susceptibles a la infección con el virus de influenza; sin embargo, en este caso las células residentes de estos tejidos no resultaron positivas. Por otro lado, es importante evaluar el papel de las células endoteliales, fibroblastos y macrófagos en la infección con *Influenzavirus*. En el caso de las células endoteliales Short y col, (2014), estudiaron el papel de estas células en la patogénesis de la infección en aves silvestres, domésticas y humanos con un enfoque particular en los virus de influenza de alta

patogenicidad, y observaron que el endotelio es un objetivo importante en la infección con *Influenzavirus* en aves domésticas y silvestres, mientras que en humanos juegan un papel importante en el control de la respuesta inflamatoria local, por lo que consideran que el endotelio juega un papel importante, pero específico de especie en la patogénesis de la enfermedad. En cuanto a la replicación del virus en fibroblastos esta ha sido descrita en cultivos celulares de fibroblastos embrionarios de pollo y fibroblastos embrionarios pulmonares de origen humano (de Oña y col, 1995; Muvundy y col, 2016), si bien la replicación del virus ha sido eficiente los títulos obtenidos han sido bajos. En relación a la replicación en macrófagos los datos son controversiales ya que hay estudios en los que se concluye que la infección es abortiva y la replicación no es eficiente (Rodgers y col, 1982; Yu y col, 2011), mientras que en otros trabajos se ha observado que ciertas cepas pueden replicarse productivamente en los macrófagos (Marvin y col, 2017).

En infecciones por influenza porcina se han descrito episodios de viremia de corta duración y con bajos títulos virales (Olsen y col, 2006) lo que sugiere que el virus es controlado por el sistema inmune antes de llegar a otro órgano o que las lesiones observadas son incipientes y por lo tanto no se asocian con la infección viral. En aves, humanos y modelos murinos se ha logrado determinar la presencia de RNA de *Influenzavirus* en sangre y en otros tejidos distintos al respiratorio durante la fase aguda de la infección, así mismo el virus está presente de manera transitoria en varios órganos como el encéfalo, hígado, bazo, riñón, corazón y músculo esquelético. (Mori y col, 1995; Tse y col, 2011) En el presente estudio la distribución de la nucleoproteína del virus de influenza en los tejidos evaluados es sugerente de viremia, debido a que es posible que el virus al estar en el torrente sanguíneo entre en contacto con las células endoteliales y monocitos los cuales pueden

migrar a los diferentes tejidos en donde fueron detectados. Por otro lado, aunque la inmunopositividad en órganos linfoides no ha sido descrita en cerdos, en un estudio realizado por De Vleeschauwer y col, (2009) se determinó la presencia de virus de influenza porcina en el bazo e íleon de cerdos inoculados con la cepa A/swine/Belgium/1/98 H1N1 mediante el uso de RT-PCR tiempo real. En el caso de las aves se sabe que los *Influenzavirus* que las afectan tienen tropismo por el tejido linfoide (Perkins y col, 2001). En el caso particular del timo Fislová y col, (2009) observaron atrofia cortical y lograron aislar y detectar mediante RT-PCR virus de influenza humana en un modelo experimental con ratones. En el presente estudio se realizó qRT-PCR a partir de los órganos linfoides embebidos en parafina y se logró detectar RNA viral en el 50% de las muestras evaluadas lo que nos permitió confirmar los resultados obtenidos por inmunohistoquímica y describir que los virus pH1N1 y swH1N1 con que fueron infectados los cerdos de las muestras que se utilizaron en esta evaluación lograron replicarse en los órganos linfoides evaluados.

Por otro lado, Fislová y col, (2009) detectaron RNA viral en el hígado de ratones inoculados con virus de influenza humana mediante RT-PCR anidado. En este estudio se detectó una escasa cantidad de muestras sospechosas a partir de los hígado, riñón y vejiga que mediante otras técnicas moleculares como el RT-PCR anidado que utilizó Fislová tal vez podrían confirmarse como positivas debido a que con el RT-PCR anidado es posible aumentar la sensibilidad de la prueba. Brookes y col, (2009) detectaron RNA viral en muestras de hisopos oculares y rectales mediante RT-PCR tiempo real. En cuanto a la excreción rectal describieron que la detección se logró en escasas muestras y que eso podría

reflejar un pobre tropismo o replicación en el tracto digestivo o inclusive sugirieron que podría existir contaminación en la región perineal con descarga nasal debido al comportamiento social de los cerdos. En el presente estudio se detectó la presencia de la nucleoproteína del virus de influenza en macrófagos presentes en el párpado, enterocitos, tejido conjuntivo y células inflamatorias en el intestino, lo cual podría explicar que la presencia de RNA viral en los hisopos rectales observada por Brookes y col, (2009) no es producto de contaminación, pero si de una baja replicación viral ya que también en nuestro estudio solo uno de los cerdos del grupo calostrado e infectado con el virus pH1N1 a los 6 DPI fue positivo a la detección de nucleoproteína en los enterocitos.

Los cambios descritos en el citoplasma de células epiteliales alveolares (neumocitos) de los pulmones evaluados por microscopia electrónica de transmisión coinciden con lo descrito por Winkler y Cheville, (1986); Goldsmith y col, (2011). Es importante señalar que además se observaron partículas virales en el citoplasma de células endoteliales y macrófagos, esto confirma que la inmunopositividad detectada por inmunohistoquímica se debe a la presencia de virus. Por otro lado, la presencia de partículas virales en el citoplasma de células endoteliales podría contribuir al desarrollo de una viremia transitoria, la cual puede presentarse cuando las partículas virales salen de estas células al final de su ciclo de replicación y son liberadas directamente al torrente sanguíneo, sin embargo en este estudio no se lograron observar partículas virales emergiendo de células endoteliales.

Conclusión

En este estudio logró confirmarse la presencia de RNA viral y partículas virales fuera del pulmón, sin embargo no se encontró evidencia de replicación viral o partículas virales en células residentes de los tejidos evaluados.

Perspectivas

El detectar RNA viral y partículas virales en células endoteliales, macrófagos y fibroblastos en tejidos diferentes al respiratorio abre una gran expectativa sobre la participación de estas células en la patogénesis de la enfermedad. Aunque la célula endotelial no ha sido considerada como un objetivo de infección por los *Alfainfluenzavirus* que afectan a los cerdos, los hallazgos en este estudio abren la puerta a preguntas sobre ¿Cuál es la participación de la célula endotelial en la patogénesis de los *Alfainfluenzavirus* porcinos?, ¿Cuál es su contribución en el desarrollo de viremia? O ¿Cómo modulan la respuesta inmune durante la fase aguda de la infección? Por otro lado, los macrófagos son la primera línea de defensa contra microorganismos en el tracto respiratorio, por lo que determinar si el virus es capaz de replicarse de forma productiva en esta célula y entender los mecanismos que el virus utiliza para evadir la función del macrófago proporcionará una mayor comprensión sobre la patogénesis y respuesta antiviral por parte del huésped.

Referencias

Stärk KD. Epidemiological Investigation of the Influence of Environmental Risk Factors on Respiratory Diseases in Swine—A Literature Review. *Vet J.* 2000 Jan;159(1):37-56.

Brockmeier SL, Halbur PG, Thacker EL. Porcine Respiratory Disease Complex. In: Brogden KA, Guthmiller JM, editors. *Polymicrobial Diseases*. Washington (DC): ASM Press; 2002. Chapter 13. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK2481/>

Opriessnig T, Giménez-Lirola LG, Halbur PG. Polymicrobial respiratory disease in pigs. *Anim Health Res Rev.* 2011 Dec;12(2):133-48. doi: 10.1017/S1466252311000120.

Shope RE. Swine Influenza : III. Filtration Experiments and Etiology. *J Exp Med.* 1931 54: 373–385

Schultz-Cherry S., Olsen CW., Easterday BC. History of Swine Influenza. In: Richt J., Webby R. (eds) *Swine Influenza. Curr Top in Microbiol and Immunol.* Springer, Berlin, Heidelberg, 2011;370:21-27. doi: 10.1007/82_2011_197

ICTV (2018). Taxonomy. In <https://talkictvonlineorg/taxonomy/> International Committee on Taxonomy of Viruses.

Olsen CW, Brown IH, Easterday BC, Van Reeth K. Swine Influenza. In Straw BE, Zimmerman JJ, D’Allaire S, Taylor DJ, editors. *Diseases of swine*. 9th ed. Ames, Iowa: Blackwell Publishing. 2006:469-482.

Janke BH. Influenza A virus infections in swine: pathogenesis and diagnosis. *Vet Pathol.* 2014 Mar;51(2):410-26. doi: 10.1177/0300985813513043. Epub 2013 Dec 20.

Brookes SM, Núñez A, Choudhury B, Matrosovich M, Essen SC, *et al.* Replication, Pathogenesis and Transmission of Pandemic (H1N1) 2009 Virus in Non-Immune Pigs. PLoS ONE. 2009; 5:e9068.

Busquets N, Segalés J, Córdoba L, Mussá T, Crisci E, Martin-Valls GE, *et al.* Experimental infection with H1N1 European swine influenza virus protects pigs from an infection with the 2009 pandemic H1N1 human influenza virus. Vet. Res. 2010; 41:74.

Zhou NN, Senne DA, Landgraf JS, Swenson SL, Erickson G, Rossow K, Liu L, Yoon KJ, Krauss S, Webster RG. Emergence of H3N2 reassortant influenza A viruses in North American pigs. Vet Microbiol. 2000; 74(1-2):47-58.

Karasin AI, Landgraf J, Swenson S, Erickson G, Goyal S, Woodruff M, *et al.* Genetic characterization of H1N2 influenza A viruses isolated from pigs throughout the United States. J Clin Microbiol. 2002 Mar;40(3):1073-9.

Wesley RD. Exposure of sero-positive gilts to swine influenza virus may cause a few stillbirths per litter. Can J Vet Res. 2004 Jul; 68(3): 215–217.

De Vleeschauwer A, Atanasova K, Van Borm S, van den Berg T, Rasmussen TB, *et al.* Comparative pathogenesis of an avian H5N2 and a swine H1N1 influenza virus in pigs. PLoS ONE. 2009; 4:e6662.

Fislová T, Gocník M, Sládková T, Durmanová V, Rajcáni J, Varecková E, *et al.* Multiorgan distribution of human influenza A virus strains observed in a mouse model. Arch Virol. 2009; 154:409-419.

Kulkarni R, Kinikar A, Valvi Ch, Doshi P. Hemorrhagic cystitis in two cases of novel influenza A (H1N1) infection. *Journal of Pediatric Infectious Diseases*. 2011; 6:77-78.

Papic N, Pangercic A, Vargovic M, Barsic B, Vince A, Kuzman I. Liver involvement during influenza infection: perspective on the 2009 influenza pandemic. *Influenza Other Respi Viruses*. 2012; 6:e2-5.

Zell R., Scholtissek C., Ludwig S. Genetics, Evolution, and the Zoonotic Capacity of European Swine Influenza Viruses. In: Richt J., Webby R. (eds) *Swine Influenza. Current Topics in Microbiology and Immunology*. Springer, Berlin, Heidelberg. 2013; 370:29-55. DOI: 10.1007/82_2012_267

Shuo Su, Xin liang Fu, Gairu Li, Fiona Kerlin & Michael Veit (2017) Novel Influenza D virus: Epidemiology, pathology, evolution and biological characteristics, *Virulence*, 8:8, 1580-1591, DOI: 10.1080/21505594.2017.1365216

Maclachlan NJ and Bubovi J. Orthomyxoviridae. In Fenner's *Veterinary Virology*. 4th ed., London: Academic Press, 2011:353-370.

Tong, S., Li, Y., Rivaller, P., Conrardy, C., Castillo, D.A., Chen, L.M., Recuenco, S., Ellison, J.A., Davis, C.T., York, I.A., Turmelle, A.S., Moran, D., Rogers, S., Shi, M., Tao, Y., Weil, M.R., Tang, K., Rowe, L.A., Sammons, S., Xu, X., Frace, M., Lindblade, K.A., Cox, N.J., Anderson, L.J., Rupprecht, C.E., Donis, R.O., 2012. A distinct lineage of influenza A virus from bats. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109, 4269–4274.

Tong S, Zhu X, Li Y, Shi M, Zhang J, et al. (2013) New World Bats Harbor Diverse Influenza A Viruses. PLOS Pathogens 9(10): e1003657. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003657>

Cheville NF. Ultrastructural pathology: An introduction to interpretation. Ames, Iowa: Iowa State University Press, 1994.

Swayne DE and Halvorson DA. Influenza. In Saif YM, Fadly AM, Glisson JR, McDougald LR, Nolan LK, Swayne DE, editors. Diseases of Poultry. 11th ed. Ames, Iowa: Iowa State University Press; 2003:135-160.

Heinen P. Swine influenza: a zoonosis. Vet Sci Tomorrow [serial online]. 2003 Sept 15. Available at: <http://www.vetscite.org/publish/articles/000041/print.html>.

Bouvier MN and Palese P. The biology of influenza viruses. Vaccine. 2008; 12 (26 Suppl 4):D49-D53.

Talledo M y Zumaeta K. Los virus de influenza y la nueva pandemia A/H1N1. Rev. Peru. Biol. 2009; 16:227-238.

Clifford M, Twigg J, Upton C. Evidence for a novel gene associated with human influenza A viruses. Virol J. 2009. 6:198. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-6-198>.

Selman M, Dankar SK, Forbes NE, Jia JJ, Brown EG. Adaptive mutation in influenza A virus non-structural gene is linked to host switching and induces a novel protein by alternative splicing. Emerg Microbes Infect. 2012;1(11):e42. doi:10.1038/emi.2012.38

Wise HM, Hutchinson EC, Jagger BW, Stuart AD, Kang ZH, Robb N, et al. (2012) Identification of a Novel Splice Variant Form of the Influenza A Virus M2 Ion Channel with an Antigenically Distinct Ectodomain. *PLoS Pathog* 8(11): e1002998. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002998>

Hayashi T, MacDonald LA, Takimoto T. Influenza A Virus Protein PA-X Contributes to Viral Growth and Suppression of the Host Antiviral and Immune Responses. *J Virol*. 2015;89(12):6442–6452. doi:10.1128/JVI.00319-15

Yamayoshi S, Watanabe M, Goto H, Kawaoka Y. Identification of a novel viral protein expressed from the PB2 segment of influenza A virus. *J Virol*. 2016;90:444–456. doi:10.1128/JVI.02175-15.

Wang Q, Li Q, Liu T, Chang G, Sun Z, Gao Z, Wang F, Zhou H, Liu R, Zheng M, Cui H, Chen G, Li H, Yuan X, Wen J, Peng D and Zhao G Host Interaction Analysis of PA-N155 and PA-N182 in Chicken Cells Reveals an Essential Role of UBA52 for Replication of H5N1 Avian Influenza Virus. *Front. Microbiol*. 2018;9:936. doi:10.3389/fmicb.2018.00936

Wang Q, Liu R, Li Q, Wang F, Zhu B, Zheng M, Cui H, Wen J, Zhao G. Host cell interactome of PB1 N40 protein of H5N1 influenza A virus in chicken cells. *J Proteomics*. 2019;197:34-41. doi: 10.1016/j.jprot.2019.02.011.

Flores-Munguía ME, Vázquez-Moreno L, Ramos-Clamont Montfort G. Glicobiología del virus de influenza A. *Rev. Latinoam. Microbiol*. 2007; 49(3-4):74-87.

Nelli KR, Kuchipudi VS, White AG, Baquero PB, Dunham PS, Chang K. Comparative distribution of human and avian type sialic acid influenza receptors in the pig. *BMC Veterinary Research*. 2010; 6:4.

Matrosovich M., Herrler G., Klenk H.D. Sialic Acid Receptors of Viruses. In: Gerardy-Schahn R., Delannoy P., von Itzstein M. (eds) *SialoGlyco Chemistry and Biology II. Topics in Current Chemistry*. Springer, Cham. 2013;367:1-28

Samji T. Influenza A: understanding the viral life cycle. *Yale J Biol Med*. 2009; 82:153-159.

Manjarrez MEZ, Cabello CG, Rosete DPO. Biología del virus: familia Orthomyxoviridae. En Pérez JRP, Salas JH, Palomar AL, Vázquez JCG. editores. *Influenza por el nuevo virus A H1N1. Un panorama integral*. México: Graphimedica, 2010:26-41

Resa-Infante P, Jorba N, Coloma R, Ortin J. The influenza virus RNA synthesis machine: advances in its structure and function. *RNA Biol*. 2011; 8:207-215.

Salazar MI, López OO, León GA, Ramírez JEG, Castro MEM. El origen de la variabilidad genética de los virus de influenza. *Gac Méd Méx*. 2010; 146:199-206.

Pleschka S. Overview of Influenza Viruses. In: Richt J., Webby R. (eds) *Swine Influenza. Current Topics in Microbiology and Immunology*. Springer, Berlin, Heidelberg. 2012; 370:1-20.

Dou D, Revol R, Östbye H, Wang H and Daniels R (2018) Influenza A Virus Cell Entry, Replication, Virion Assembly and Movement. *Front. Immunol.* 9:1581. doi: 10.3389/fimmu.2018.01581

Neumann G, Noda T, Kawaoka Y. Emergence and pandemic potential of swine-origin H1N1 influenza virus. *Nature.* 2009; 459:931-939

Atkin-Smith GK, Duan M, Chen W, Poon IKH. The induction and consequences of Influenza A virus-induced cell death. *Cell Death Dis.* 2018; 25;9(10):1002. doi: 10.1038/s41419-018-1035-6.

Zhou NN, Senne DA, Landgraf JS, Swenson SL, Erickson G, Rossow K, Liu L, Yoon KJ, Krauss S, Webster RG. Emergence of H3N2 reassortant influenza A viruses in North American pigs. *Vet Microbiol.* 2000; 74(1-2):47-58.

Karasin AI, Landgraf J, Swenson S, Erickson G, Goyal S, Woodruff M, *et al.* Genetic characterization of H1N2 influenza A viruses isolated from pigs throughout the United States. *J Clin Microbiol.* 2002 Mar;40(3):1073-9.

Wesley RD. Exposure of sero-positive gilts to swine influenza virus may cause a few stillbirths per litter. *Can J Vet Res.* 2004 Jul; 68(3): 215–217.

Caswell JL and Williams KJ. Respiratory system. In Maxie MG. editor. Jubb, Kennedy, and Palmer's Pathology of Domestic Animals. Vol. 2. 5th ed., Edinburgh: Elsevier. 2007:581-583.

Vincent LL, Janke BH, Paul PS, Halbur PG. A monoclonal-antibody-based immunohistochemical method for the detection of swineinfluenza virus in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *J Vet Diagn Invest.* 1997;9(2):191-5

Richt JA, Lekcharoensuk P, Lager KM, Vincent AL, Loiacono CM, Janke BH, Wu WH, Yoon KJ, Webby RJ, Solórzano A, García-Sastre A. Vaccination of pigs against swine influenza viruses by using an NS1-truncated modified live-virus vaccine. *J. Virol.* 2006;80(22):11009-18

Guarner J, Paddock CD, Shieh WJ, Packard MM, Patel M, Montague JL, Uyeki TM, Bhat N, Balish A, Lindstrom S, Klimov A, Zaki SR, Histopathologic and Immunohistochemical Features of Fatal Influenza Virus Infection in Children during the 2003–2004 Season, *Clinical Infectious Diseases.* 2006; (43)2:132–140, <https://doi.org/10.1086/505122>

Buchwalow IB, Böcker W. Antibodies for Immunohistochemistry. In: *Immunohistochemistry: Basics and Methods.* Springer, Berlin, Heidelberg. 2010; 1-8. https://doi.org/10.1007/978-3-642-04609-4_1

Janke B.H. Clinicopathological Features of Swine Influenza. In: Richt J., Webby R. (eds) *Swine Influenza. Current Topics in Microbiology and Immunology.* Springer, Berlin, Heidelberg. 2013;370:69-83.

Winkler GC and Cheville NF. Ultrastructural morphometric investigation of early lesions in the pulmonary alveolar region of pigs during experimental swine influenza infection. *Am J Pathol.* 1986; 122:541-552.

Haines DM, Waters EH, Clark EG. Immunohistochemical detection of swine influenza A virus in formalin-fixed and paraffin-embedded tissues. *Can J Vet Res.* 1993 Jan; 57(1):33-6.

Jung T, Choi C, Chae C. Localization of swine influenza virus in naturally infected pigs. *Vet Pathol.* 2002 Jan; 39(1):10-6.

Rajão, Daniela S., Couto, Diego H., Gasparini, Marcela R., Costa, Adrienny T.R., Reis, Jenner K.P., Lobato, Zélia I.P., Guedes, Roberto M.C., & Leite, Rômulo C. Diagnosis and clinic-pathological findings of influenza virus infection in Brazilian pigs. *Pesquisa Veterinária Brasileira.* 2013. 33(1): 30-36. <https://dx.doi.org/10.1590/S0100-736X2013000100006>

Gill J.R., Sheng Z., Ely S.F., Guinee D.G., Beasley M.B., Suh J., Deshpande C., Mollura D.J., Morens D.M., Bray M., Travis W.D. & Taubenberger J.K. Pulmonary pathologic findings of fatal 2009 pandemic influenza a/h1n1 viral infections. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 2010.134:235-243.

Nakajima N., Sato Y., Katano H., Hasegawa H., Kumasaka T., Hata S., Tanaka S., Amano T., Kasai T., Chong J.M., Iizuka T., Nakazato I., Hino Y., Hamamatsu A., Horiguchi H., Tanaka T., Hasegawa A., Kanaya Y., Oku R., Oya T. & Sata T. Histopathological and immune-histochemical findings of 20 autopsy cases with 2009 H1N1 virus infection. *Mod. Pathol.* 2012.25:1-13.

Sreta D., Kedkovid R., Tuamsang S., Kitikoon P. & Thanawongnuwech R. Pathogenesis of swine influenza virus (Thai isolates) in weanling pigs: An experimental trial. *Viol. J.* 2009. 6. DOI:10.1186/1743-422X-6-34.

de Oña M, Melón S, de la Iglesia P, Hidalgo F, Verdugo AF. Isolation of influenza virus in human lung embryonated fibroblast cells (MRC-5) from clinical samples. *J Clin Microbiol.* 1995 Jul;33(7):1948-9. PubMed PMID: 7665680; PubMed Central PMCID: PMC228309.

Muvunyi CM, Wilde M, Dennington D, Yates C. Efficient replication but low titer growth of influenza virus in immortalized chick embryo fibroblast cell line. *RMJ.* 2016. 73(3)

Rodgers B.C. & Mims C.A. 1982. Influenza virus replication in human alveolar macrophages. *J. Med. Virol.* 9:177-184.

Yu W.C., Chan R.W., Wang J., Travanty E.A., Nicholls J.M., Peiris J.S., Mason R.J. & Chan M.C. 2011. Viral replication and innate host responses in primary human alveolar epithelial cells and alveolar macrophages infected with Influenza H5N1 and H1N1 viruses. *J. Virol.* 85:6844-6855.

Marvin SA, Russier M, Huerta CT, Russell CJ, Schultz-Cherry S. Influenza Virus Overcomes Cellular Blocks To Productively Replicate, Impacting Macrophage Function. *J Virol.* 2017;91(2):e01417-16. Published 2017 Jan 3. doi:10.1128/JVI.01417-16

Mori I, Komatsu T, Takeuchi K, Nakakuki K, Sudo M, Kimura Y. Viremia induced by influenza virus. *Microb Pathog.* 1995;19(4):237-44.

Tse H, To KKW, Wen X, Chen H, Chan K-H, Tsoi H-W, et al. (2011) Clinical and Virological Factors Associated with Viremia in Pandemic Influenza A/H1N1/2009 Virus Infection. PLoS ONE 6(9): e22534. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0022534>

Short KR, Veldhuis Kroeze EJ, Reperant LA, Richard M, Kuiken T. Influenza virus and endothelial cells: a species specific relationship. *Front Microbiol.* 2014;5:653. Published 2014 Dec 2. doi:10.3389/fmicb.2014.00653

Perkins LE, Swayne DE. Pathobiology of A/Chicken/Hong Kong/220/97 (H5N1) avian influenza virus in seven gallinaceous species. *Vet Pathol.* 2001; 38:149-164

Goldsmith CS, Metcalfe MG, Rollin DC, Shieh WJ, Paddock CD, Xu X, et al. Ultrastructural characterization of pandemic (H1N1) 2009 virus. *Emerg Infect Dis.* 2011; 17:2056-2059.

