

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**MUTACIONES EN EPÍTOPES DE NEUTRALIZACIÓN DE LA PROTEÍNA
M1 DEL VIRUS INFLUENZA DE EQUINOS Y CANINOS DEL ESTADO DE
NUEVO LEÓN**

POR

M.C. CLAUDIA BERNARDETTE PLATA HIPÓLITO

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN INMUNOBIOLOGÍA**

NOVIEMBRE, 2019

MUTACIONES EN EPÍTOPES DE NEUTRALIZACIÓN DE LA PROTEÍNA M1
DEL VIRUS INFLUENZA A DE EQUINOS Y CANINOS DEL
ESTADO DE NUEVO LEÓN

COMITÉ DE TESIS

DR. JUAN FRANCISCO CONTRERAS CORDERO
(PRESIDENTE)

DRA. LYDIA GUADALUPE RIVERA MORALES
(SECRETARIO)

DRA. LICET VILLARREAL TREVIÑO
(VOCAL)

DR. CARLOS EDUARDO HERNÁNDEZ LUNA
(VOCAL)

DR. MOISÉS FRANCO MOLINA
(VOCAL)

MUTACIONES EN EPÍTOPES DE NEUTRALIZACIÓN DE LA PROTEÍNA M1
DEL VIRUS INFLUENZA A DE EQUINOS Y CANINOS DEL
ESTADO DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN DE TESIS



DR. JUAN FRANCISCO CONTRERAS CORDERO
(DIRECTOR)



DRA. SIBILINA CEDILLO ROSALES
(DIRECTOR EXTERNO)

LUGAR DE TRABAJO

El presente trabajo de investigación se realizó en la Unidad de Virología del Laboratorio de Inmunología y Virología, del Departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la dirección del Dr. Juan Francisco Contreras Cordero.

AGRADECIMIENTOS

Primeramente, quiero agradecer al Laboratorio de Inmunología y Virología a cargo de la ***Dra. Cristina Rodríguez Padilla*** por permitirme desarrollar mi trabajo de tesis para obtener el grado académico de Doctor en Ciencias con Orientación en Inmunobiología. Mi eterno agradecimiento al ***Dr. Juan Francisco Contreras Cordero***, por proporcionarme las herramientas y el apoyo necesario para realizar este trabajo de investigación. Su ejemplo, disciplina y entrega profesional son una inspiración para seguir creciendo como investigador y como persona. Muchas gracias.

Agradezco a mi Comité de tesis conformado por la ***Dra. Lydia Rivera Morales, Dra. Licet Villarreal Treviño, Dr. Carlos Eduardo Hernández Luna*** y el ***Dr. Moisés Franco Molina*** por el enriquecimiento profesional brindado durante el desarrollo de este trabajo. A la ***Dra. Sibilina Cedillo Rosales*** y al ***M.C. Nelson Obregón Macías*** de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UANL por la colaboración brindada con las muestras de perros y caballos utilizadas en este estudio. Alex Arreola Triana por su interés y soporte durante las ediciones del artículo de investigación, gracias!

Tuve la suerte de contar con un gran equipo de trabajo, que siempre me apoyó en la realización de esta tesis. Agradezco a mis compañeros del Laboratorio de Virología L-11, a ***Alejandro José Rodríguez García*** por acompañarme en esta travesía donde encontré a un verdadero amigo. A ***Tania Guadalupe Heredia Torres*** y ***Yuliet Ramírez Citra***, por apoyarme y escucharme en los momentos difíciles y sobre todo ¡Gracias por Ixtapa! A los compañeros que he tenido la oportunidad de verlos crecer y aprender del fascinante mundo de la Virología: ***Victoria, Anaí, Marla, Magali, Ludi, Virginia, Jorge, Ramón, entre otros***. Gracias por su compañerismo y apoyo durante mi estancia en el doctorado. A mis compañeras del doctorado, grandes amigas que siempre estarán en mi corazón, la ***Dra. Mariela Arellano, Dra. Yareellys Ramos, cDra. Mayra Sánchez***, las quiero muchísimo, gracias por todo su apoyo y cariño! A mis amigos ***Luis Hebert, Edgardo, Aaron, Adrián, Karla Cabañas, Katia, Carolina, mis amigas de la célula 168, Vero, Julio, Mayra, Zulema, César, Juan José***. ¡Gracias!

Un especial agradecimiento a la ***Dra. Griselda Edith Menchaca Rodríguez*** por ser un verdadero apoyo durante el desarrollo de este trabajo, así como permitirme ser su amiga y aprender tanto de ella.

Al personal administrativo de la Facultad de Ciencias Biológicas y la Subdirección Académica de Posgrado, por el seguimiento de los trámites y procesos llevados a cabo durante mi estancia en el posgrado.

Al ***cDr. David Daniel Fernández*** Chapa por su apoyo y amor. Por tener fe en mí y ser una inspiración constante en mi vida a cumplir mis sueños. Gracias por abrir mis alas. Muchas gracias.

Mi amor, cariño y agradecimiento a ***mi familia***. Tengo la fortuna de que mis mejores amigos, son mis hermanos ***Ana Luisa*** y ***César Emiliano Plata Hipólito***. Sin su constante apoyo y aliento, este trabajo no habría sido terminado ni yo sería quién soy. Muchas gracias. A ***mi mamá***, por darme las alas para volar hacia mis sueños y siempre estar conmigo cuando más la necesito. A mi cuñado ***Roberto Gamboa***, por darme el ejemplo del que el amor suma y no resta. Gracias. A mis sobrinos ***Roberto*** y ***Damián***, solo ustedes bastan para que mi vida sea hermosa. A ***mi padre***, mi ángel guardián. Sé que estás viendo esto y sé exactamente que dirías. Gracias por darme y enseñarme tanto, nos volveremos a encontrar.

Todo es para y por ustedes. Los amo mucho.

DEDICATORIA

El presente trabajo de investigación está dedicado a mi papá, José Luis Plata Hernández. Porque él sembró en mí la semilla de la ciencia, mi hambre de conocimiento y el amor por la lectura.

INDICE

INDICE DE TABLAS	10
INDICE DE FIGURAS	11
LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS	12
RESUMEN	14
ABSTRACT	15
1. INTRODUCCIÓN	16
2. ANTECEDENTES	18
2.1 Etiología	18
2.2 Evolución de la Influenza Equina	19
2.3 Transmisión de Influenza Equina	19
2.4 Influenza canina (CIV)	21
2.5 Características de la proteína de Matriz M1	21
2.6 Características genéticas y antigénicas	22
2.7 Variabilidad genética	23
2.8 Actividad neutralizante de anticuerpos anti-M1	24
3. JUSTIFICACIÓN	25
4. HIPÓTESIS	26
5. OBJETIVO GENERAL	27
5.1 OBJETIVOS PARTICULARES	27
6. MATERIAL Y MÉTODOS	28
6.1 Comité de ética	28
6.2 Área de estudio y muestreo	28
6.3 Colección de muestras	29
6.4 Aislamiento de ARN viral y amplificación del gen 7 de matriz	29
6.5 Análisis de mutaciones y árbol filogenético	29
6.6 Proteína de matriz M1 recombinante	30

6.7 Anticuerpos policlonales	31
6.8 Seroprevalencia a través de ELISA HADAS	31
6.9 Adaptación de cepas de campo de Influenza A en línea celular VERO	32
6.10 Cuantificación de partículas virales a través de Unidades Formadoras de Placa (UFP)	32
6.11 Cuantificación de partículas virales a través de Unidades Formadoras de Foco (UFF)	33
6.12 Ensayo de neutralización viral con anticuerpos de campo y anti-M1 recombinante	34
6.13 Análisis de epítopes neutralizantes de la proteína M1 del virus Influenza A	35
7. RESULTADOS	36
7.1 Amplificación del gen 7 de matriz del virus Influenza A	36
7.2 Análisis de secuencia del gen de la matriz.	37
7.3 Seroprevalencia del virus Influenza A en equinos y caninos	43
7.4 Propagación de aislamientos virales en cultivo de células	45
7.5 Ensayos de cuantificación viral	48
7.6 Ensayos de neutralización viral	49
7.7 Determinación de mutaciones presentes en epítopes de neutralización de M1	50
8. DISCUSIÓN	52
9. CONCLUSIONES	56
10. BIBLIOGRAFÍA	57
11. RESUMEN BIOGRÁFICO	65

ÍNDICE DE TABLAS

N °	Título de tabla	Pág
1	Colección de muestras de caninos utilizadas en la detección del gen de matriz del virus Influenza A del estado de Nuevo León.	36
2	Colección de muestras de equinos utilizadas en la detección del gen de matriz del virus Influenza A del estado de Nuevo León.	37
3	Análisis de identidad de las secuencias obtenidas durante el estudio utilizando la herramienta BLAST del NCBI.	37
4	Síntomas predominantes en la población de perros muestreada.	45
5	Síntomas predominantes en la población de equinos muestreada.	45
6	Actividad neutralizante de anticuerpos y lisados obtenidos durante este estudio.	50
7	Predicción de epítopes de la secuencia codificante de la proteína de matriz M1 utilizando la herramienta bioinformática <i>Epitope Prediction and Analysis Tools</i> de la <i>IEDB Analysis Resource</i> .	51
8	Secuencias consenso de aminoácidos presentes en el gen de matriz del virus Influenza A en aves, humanos, equinos y caninos. Las diferencias en las secuencias equinas y caninas están marcadas en rojo.	51

ÍNDICE DE FIGURAS

N °	Pie de figura	Pág
1	Alineamiento de secuencias nucleotídicas parciales de M1 con secuencias de cepas del linaje americano.	38
2	Alineamiento de secuencias aminoacídicas de M1 con secuencias de cepas del linaje americano.	39
3	Modelamiento de la proteína M1 de matriz del virus Influenza A. La región enmarcada corresponde a los aminoácidos 10 al 80 analizados en este estudio.	39
4	Análisis filogenético de secuencias deducidas de aminoácidos de la proteína M1 de aislamientos de caninos de Nuevo León, México.	41
5	Análisis filogenético de secuencias deducidas de aminoácidos de la proteína M1 de aislamientos de equinos de Nuevo León, México.	42
6	Análisis filogenético de secuencias deducidas de aminoácidos de la proteína M1 de aislamientos de equinos y caninos con secuencias zoonóticas y cepas ancestrales.	43
7	SDS-Page de proteína recombinante M1. Tinción con azul de comassie, el análisis semi-cuantitativo se realizó a través de concentraciones de albumina.	44
8	Análisis antigénico de la proteína recombinante M1 a través de un ensayo de Western blot utilizando un anticuerpo comercial.	44
9	Propagación de aislamientos de campo en línea celular VERO.	46
10	Actividad lítica sobre la línea celular VERO por aislamientos de equinos positivos a Influenza A virus.	46
11	Efecto citopático sobre la línea celular VERO por aislamientos de equinos positivos a Influenza A virus.	47
12	Ensayos de RT-PCR amplificando la región de 244 pb del gen de matriz durante la propagación de los aislamientos en cultivo celular.	47
13	Ensayos de cuantificación viral por unidades formadoras de placas (UFP) y unidades formadoras de foco (UFF).	48
14	Ensayos de cuantificación viral por unidades formadoras de placas (UFP) y unidades formadoras de foco (UFF).	48
15	Ensayos de actividad neutralizante de anticuerpos de campo, anticuerpos anti-M1 y anticuerpos vacunales contra cepas de Influenza A propagadas en la línea celular VERO.	49

LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

aa	Aminoácidos
DNA	Ácido desoxirribonucleico
cDNA	Cadena complementaria de DNA
RNA	Ácido ribonucleico
CIV	Canine Influenza Virus
EIV	Equine Influenza Virus
DH5 α	Nombre de cepa de <i>E.coli</i> utilizada en protocolos de clonación
M1	Gen de matriz del virus Influenza A
°C	Grados centígrados
h	Hora
IPTG	Isopropil β -D-1-thiogalactopyranosido
kDa	Kilo Dalton
LB	Luria-Bertoni
M	Mol
mA	Miliamperios
mg	Miligramos
mM	Milimoles
μ M	Micromoles
min	Minutos
ml	Militros
μ l	Microlitros
MEM	Medio esencial minimo
ng	Nanogramos
nm	Nanómetros
pb	Pares de bases de nucleótidos
PBS	Buffer salino de fosfatos
pi	Posterior a la infección

BL21 (DE3)	Nombre de cepa de <i>E.coli</i> utilizada para producir proteínas recombinantes
D-MEM	Medio de Eagle modificado de Dulbecco's
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
HRP	Peroxidasa de rábano
UFF	Unidad formadora de foco
UFP	Unidad formadora de placa

RESUMEN

El virus Influenza A es un agente infeccioso altamente contagioso responsable de panzootias, epizootias y pandemias alrededor del mundo. Tiene el potencial para generar variantes antigénicas que escapan a la inmunidad protectora conferida por las vacunas o infecciones previas. Una estrategia para ampliar el control sobre el virus es desarrollar una inmunidad heterosubtípica en el hospedero a través de las proteínas más estables del virión. El presente trabajo tuvo como objetivo identificar mutaciones presentes en los epítopes responsables de la neutralización del virus Influenza A. Para ello se realizó la detección del gen 7 en 6 (75%) muestras de hisopado nasal de caballos y 20 (29.41%) muestras de perros del estado de Nuevo León. Se dedujo la identidad genética de las secuencias obtenidas, encontrando un 94 – 98% de identidad con secuencias del gen M de cepas H3N2 y H1N1/2009. El estudio de seroprevalencia mostró una prevalencia del 100% (123) en la población de perros y un 92.68% (114) en la población de equinos. Aunado a esto, se determinó a través de los ensayos en cultivo de células la capacidad neutralizante de anticuerpos policlonales producidos por una infección natural sobre anticuerpos inducidos por la vacunación. Finalmente, el análisis de mutaciones en los epítopes de M1 responsables de la neutralización viral, muestran una alta tolerancia de la proteína a cambios antigénicos en la región C-terminal. Lo que promueve la aplicación de M1 como un antígeno capaz de inducir una respuesta inmune protectora con tolerancia a las mutaciones presentes en los aminoácidos 10 - 80 analizados en este estudio.

ABSTRACT

Influenza A virus is a highly contagious infectious agent responsible for panzootias, epizootics and pandemics around the world. It has the potential to generate antigenic variants that escape the protective immunity conferred by previous vaccines or infections. A strategy to expand control over the virus is to develop a heterosubtypical immunity in the host through the more stable virion proteins. The present work aimed to identify mutations present in the epitopes responsible for the neutralization of the Influenza A virus. The detection of the M gene in 6 (75%) samples of horse nasal swabs and 20 (29.41%) samples of dogs of the state of Nuevo León was performed. The genetic identity of the sequences obtained was deduced, finding 94-98% identity with sequences of the M gene of strains H3N2 and H1N1/2009. The seroprevalence study showed a prevalence of 100% (123) in the dog population and 92.68% (114) in the horse population. In addition to this, the predominant neutralizing capacity of polyclonal antibodies produced by a natural infection on antibodies induced by vaccination was determined through neutralization tests. Finally, the analysis of mutations in M1 epitopes responsible for viral neutralization show a high tolerance of the protein to antigenic changes in the C-terminal region. This promotes the application of M1 as an antigen capable of inducing a protective immune response with tolerance to the mutations present in amino acids 10-80 analyzed in this study.

1. INTRODUCCIÓN

Si bien el virus Influenza A tiene amplia circulación a nivel mundial, las infecciones constantes no representan una protección efectiva contra el virus a largo plazo. La emergencia de nuevas variantes que escapan a la inmunización protectora proporcionada por la vacuna o infecciones previas son responsables de causar brotes epidémicos, pandemias y panzootias alrededor del mundo, lo cual representa una amenaza para la población humana y animal (Ramírez *et al.*, 2014; Sandt *et al.*, 2012). Fármacos y vacunas dirigidos a controlar la infección viral tienen como blanco los antígenos de superficie del virus, los cuales representan las proteínas más susceptibles a mutación y cambio antigénico. Recientemente se ha buscado elaborar vacunas a base de las regiones o proteínas más estables del virus y de esta forma conferir una inmunidad protectora que se puede extender a diferentes variantes genéticas de uno o varios subtipos. Entre estas proteínas, destaca la proteína de matriz M1 debido a su estabilidad genética por su estrecha interacción con el RNA viral. Esta proteína ha sido propuesta como candidata para una vacuna universal que confiera protección contra diferentes variantes del virus Influenza incluyendo cepas animales y humanas. El uso de proteínas conservadas que generen una respuesta cruzada de anticuerpos, puede ser una estrategia atractiva para determinar los epítopes responsables de inducir una respuesta neutralizante y a su vez, identificar las mutaciones puntuales en estas proteínas que le confieren la capacidad para escapar a la neutralización viral (Zheng *et al.*, 2013; Sui *et al.*, 2010).

En México, la industria equina cuenta con al menos 6.4 millones de cabezas de caballos destinados a diferentes actividades, incluyendo turismo, recreación, consumo y transporte de residuos (SAGARPA, 2012). En Nuevo León, cientos de caballos son sometidos a intensas jornadas de trabajo y se pueden observar con anemia y desnutrición. Diversas infecciones y enfermedades respiratorias son las principales causas de muerte de estos animales. Brigadas de vacunación no gubernamentales brindan atención médica a equinos proporcionándoles vacunas antitetánicas, desparasitantes e información adicional sobre el cuidado animal. No obstante, no se proporciona una vacunación contra el virus Influenza A que es el principal responsable de enfermedades respiratorias en equinos y otras especies animales.

La importancia de esta enfermedad radica en su rápida diseminación en caballos no vacunados e inadecuados procedimientos de cuarentena en los animales infectados (Gaíva *et al.*, 2014). Factores como la amplia diseminación del virus llevada a cabo esencialmente por aves silvestres, la constante recombinación del virus y la tasa de error de la polimerasa viral son responsables del potencial de evasión del sistema inmune y la transmisión constante entre diferentes especies animales. En el 2005 se reportó la transmisión de Influenza equina a un grupo de perros que presentaron un cuadro respiratorio agudo posterior a la exposición. Estudios moleculares de estos aislamientos indican que el genoma de Influenza equina e Influenza canina presentan un linaje monofilético. Sin embargo, las mutaciones observadas en la hemaglutinina de la cepa canina fueron responsables de que la cepa transmitida de caballo a perro no pueda ser retransmitida al huésped original (Crawford *et al.*, 2005) dando lugar al nacimiento del linaje de Influenza canina.

Recientemente se han utilizado alternativas de detección que basan su efectividad en las proteínas más estables del virus, cómo son la nucleoproteína y la proteína de matriz. Esta última ampliamente utilizada en estudios de epidemiología en animales no vacunados debido a que generan una respuesta celular heterosubtipica al virus (Rozek *et al.*, 2003; Staneková y Varečková, 2010, Landolt *et al.*, 2014). Esta proteína es estable en diferentes especies animales como lo indica la detección de M1 pandémica en especies aviares del sur de América. En virtud de que estas aves son asintomáticas a la infección, representan una vía libre de transmisión y recombinación de cepas panzoóticas (Mathieu *et al.*, 2010). No obstante, la dinámica de recombinación, rearrreglos génicos y mutaciones puntuales que caracterizan estos virus, la proteína M1 continúa siendo una proteína estable del virus entre cepas con diferente subtipo. Por tal motivo, el identificar las mutaciones presentes en los epítopes de neutralización de M1, podría ampliar las alternativas de control del virus influenza A.

2. ANTECEDENTES

La influenza es una enfermedad reemergente altamente contagiosa que afecta a una amplia gama de hospederos. El agente causal de esta enfermedad es el virus Influenza A, responsable de panzootias, epizootias y pandemias que tienen lugar en la población humana y animal. De manera que afecta al sector salud y socioeconómico de la población. Organismos como el Centro de Control de Enfermedades (CDC) y la Organización Mundial de la Salud (OMS) son responsables de la vigilancia epidemiológica del virus, así como de la constante actualización de la vacuna con las cepas pandémicas circulantes (Elton y Bryant, 2011).

2. 1 Etiología

El virus Influenza posee un genoma de ocho segmentos de RNA y polaridad negativa que generalmente codifican para 11 a 14 proteínas, incluyendo N40, una nueva proteína que es expresada por el segmento PB1 (Wise *et al.*, 2012). La tipificación del virus se lleva a cabo por sus dos antígenos internos, la proteína de matriz (M1) y la nucleocápside (NP) mientras que la subtipificación se realiza dependiendo de las propiedades antigénicas de sus dos glicoproteínas de membrana: Hemaglutinina (HA) y Neuraminidasa (NA). HA posee un rol importante en la determinación del tropismo celular, debido a que se une a una serie de receptores que contienen una terminal α -2,6 o α -2,3 de residuos de ácido siálico. Generalmente el receptor α -2,6 se encuentra en las células epiteliales del sistema respiratorio de humanos y cerdos, mientras que el α -2,3 se presenta en las células epiteliales del sistema digestivo de aves silvestres y domésticas (Mancipe *et al.*, 2011). La secuencia de aminoácidos de este sitio de corte es reconocido por las proteasas celulares en condiciones normales, mientras que en una infección por Influenza A este sitio modula el tropismo del tejido y la diseminación sistémica, afectando la severidad de la enfermedad. La actividad de la NA es crucial para la eliminación del ácido siálico que contienen los receptores de las membranas celulares y virales, un proceso que es indispensable para la liberación de los nuevos viriones de la superficie de la célula huésped.

2. 2 Evolución de la Influenza Equina

Hasta la fecha se han reportado 18 subtipos de HA y 11 de NA, H1-H16/N1-N9 se presentan en aves, H17-H18/N10-N11 en murciélagos y dos cepas más derivadas de las aves que circulan en la población humana H1N1 y H3N2 (Tong *et al.*, 2013) y recientemente se han reportado dos cepas nuevas en caninos y equinos H3N8 y H3N2. En general, los subtipos de la HA son clasificados en dos linajes basados en sus propiedades antigénicas y sus principales características estructurales. El grupo 1 engloba los clados H1a, H1b y H9, que incluyen la HA de las cepas pandémicas H1N1 de 1918 y 2009, así como la HA de las cepas H5N1 clasificadas como cepas de Alta Patogenicidad de Influenza Aviar (HPAI). El grupo 2 consiste en el clado H3 y el H7, los cuales contienen las cepas humanas H3N2, la cepa H7N7 de HPAI y las cepas H7N7 y H3N8 de cepas equinas (Medina y García, 2011, Landolt, 2014).

En 1980 la evolución genética del linaje equino H3N8 resultó en 2 linajes evolutivos distintos: El euroasiático y el americano. Continuando con la divergencia genética de los virus del linaje americano, se produjo de manera subsecuente 3 sublinajes: América del Sur, Kentucky y Florida. Recientemente el sublinaje Florida evolucionó a dos grupos distintos, denominados clado 1 y clado 2. No obstante, aunque los virus del clado 1 predominan en América también se han diseminado, causando brotes en Europa, Australia, África y Asia, donde se han aislado originalmente los virus del clado 2 (Bryant *et al.*, 2009). El subtipo H7N7 no ha sido aislado de caballos desde los años 70s, por lo que subtipos representativos de este linaje no son considerados en la vacuna equina recomendada por *World Organisation for Animal Health* (OIE). Esto, en contraste con la divergencia del sublinaje Florida cuyas cepas predominantes constituyen de manera atenuada la vacuna contra influenza equina (OIE, 2015).

2. 3 Transmisión de Influenza Equina

Por décadas se ha considerado que el caballo es un hospedero terminal del virus de influenza, es por ello por lo que se le considera genéticamente estable comparado con los linajes humanos, sin embargo, esto no significa que se encuentre en una estasis evolutiva. Como prueba de ello, está el reciente descubrimiento de la transmisión de influenza equina a caninos. No obstante, el intercambio de viriones y sus segmentos de genes entre equinos

y otras especies es limitada. La transmisión de la cepa H3N8 de influenza equina a caninos de Estados Unidos, Reino Unido y Australia cambia esta noción. Aunado a estos eventos de reacción cruzada, se han realizado estudios donde se determina la diseminación del virus de Influenza equina inoculado de manera experimental en caballos que contagian a caninos que conviven en el mismo sitio de hacinamiento (Pecoraro *et al.*, 2014, Cullinane *et al.*, 2010). Los caninos expresan de manera predominante residuos de ácido siálico α - 2,3 a lo largo del tracto respiratorio, esto proporciona una explicación para la aparente susceptibilidad de los perros a la infección tanto de la cepa equina como la canina, las cuales tienen preferencia por este ligando. Aun así, se ha encontrado que mientras la cepa equina muestra una preferencia clara por los receptores Neu5Gc, aislamientos caninos no parecen tener preferencia por este receptor o un análogo (Yamanaka *et al.*, 2010). A la luz de estas preferencias por receptores, se podría esperar que el virus tenga la capacidad de reinfectar de manera inversa, es decir de canino a equino. Curiosamente, esto se ha intentado dilucidar con ensayos donde dos cepas diferentes de influenza canina H3N8 fueron incapaces de infectar, replicar y difundir en células epiteliales de equinos. Además de la inoculación, los caballos no presentaron sintomatología alguna, lo que sugiere que otros factores diferentes a la preferencia por el receptor, contribuyen a la especificidad de la especie canina y la influenza equina H3N8 (Yamanaka *et al.*, 2010).

Por lo ya mencionado es evidente la diversidad genética que presentan los antígenos de superficie, es por ello que recientes trabajos de investigación están en la búsqueda de antígenos más estables genéticamente y que confieran una inmunidad protectora al huésped. La combinación de antígenos conservados del virus Influenza A inducen una respuesta cruzada de anticuerpos, esto es debido a los epítopes activadores de células T citotóxicas.

2.4 Influenza canina (CIV)

El virus de la influenza canina (CIV) es una infección zoonótica que se transmite de caballos a perros (Crawford *et al.*, 2005) y aves (Song *et al.*, 2008). Desde entonces, el virus se ha establecido dentro de la población de mascotas y perros callejeros, ocasionalmente causando brotes epizooticos en sitios superpoblados, como refugios de animales. En la actualidad, CIV se distribuye actualmente en al menos 30 estados de los

Estados Unidos (Voorhees et al., 2017, CDC, 2019). La detección del virus de la influenza equina (EIV) ocurre en brotes esporádicos en todo el mundo, donde esencialmente, la enfermedad se distribuye entre caballos no vacunados en condiciones precarias de salud animal (Gaíva et al., 2014; Singh et al., 2018; Sack et al., 2019).

Varios factores podrían contribuir a la aparición del virus de la influenza A en animales de compañía, como la ausencia de vacunación (Gaíva et al., 2014), la coinfección con otros agentes respiratorios (Metzger y Sun, 2013) y la coexistencia con personas infectadas y animales en malas condiciones de salud (Holt et al., 2010; Hayward et al., 2010).

2.5 Características de la proteína de Matriz M1

La proteína de matriz es la proteína más abundante del virus (1,000 a 3,000 copias), se encuentra formando la cápside del virus, por lo que tiene un papel estructural, además, juega un papel muy importante durante el ciclo replicativo del virión ya que desempeña varias funciones dentro de la célula huésped, entre las que destacan:

La inhibición de la transcripción (Sha y Luo *et al*; 1997), favorece la translocación del complejo ribonucleoproteico del núcleo de la célula infectada hacia su citoplasma (Ye *et al*; 1999), Interacciona con las regiones citoplasmáticas de las proteínas Hemaglutinina y Neuraminidasa para favorecer la multimerización de la proteína M1 (Ali *et al*; 2000). Además, interacciona con la membrana mediante cuatro regiones opuestas: Hélice 1, Hélice 4, Hélice 6, Hélice 7 (Sha y Luo, 1997), promueve el inicio de la formación de la partícula viral de la célula hospedera (Nayak *et al*; 2004). Tiene dominios de interacción con caspasas antiapoptóticas (Zhimov *et al*; 1999), entre muchas funciones más.

La proteína M1 de matriz es codificada por el segmento 7 del genoma que es conformado por 1027 nt, este gen tras sufrir una splicing alternativo genera la proteína de canal iónico (M2), ocasionalmente M3 que se le adjudican funciones similares a las del canal iónico pero en diferentes cepas y recientemente se ha reportado la traducción de la proteína M42 aún sin una función definida. M1 está compuesta por 252 aminoácidos, de los cuales 169 han sido dilucidados a diferentes pH mediante cristalografía de rayos-X (Sha y Luo, 1997;

Harris *et al*; 2001). M1 en un estado basal forma dímeros, mientras que al oligomerizar forma una estructura terciaria conformada por 8 alfa hélices y una hélice 3-10 (Sha *et al.*, 1997; Zhao *et al.*, 1998). Estos oligómeros están organizados de manera que la superficie hidrofóbica se asocia a los lípidos de la envoltura, mientras que la superficie opuesta cargada positivamente se une al RNA expuesto por los complejos RNPs, conectándose así a los componentes del interior del virión con las proteínas de membrana (Nayak *et al.*, 2004).

Artz en el 2010, propone que la región amino-terminal comprendida entre los aminoácidos 1 a 164 se encuentra estructurada por alfa hélices y adopta una forma compacta; mientras que el extremo carboxilo-terminal, que abarca los aminoácidos del 165 al 252 se encuentra poco estructurada adoptando una conformación extendida (Artz *et al*; 2001). Así como Maya Martínez en el 2011, presentó información sobre la estabilidad estructural y el correcto plegamiento que adopta en su conformación nativa. Utilizando cálculos computacionales y dinámica molecular, también se analizó la estabilidad/plasticidad conformacional bajo diferentes condiciones que simulan el proceso de infección en la célula hospedera.

2.6 Características genéticas y antigénicas

El virus se encuentra envuelto en una capa lipídica, posee una simetría helicoidal y posee una estructura pleomórfica. La cápside, conformada por monómeros de M1 están en constante contacto con la matriz extracelular del tejido infectado, por lo que la proteína de matriz es reconocida por células del sistema inmunológico, asimismo por los anticuerpos que se producen en contra de esta proteína después de la infección (Noda *et al*; 2012).

Se han realizado diversos estudios para producir anticuerpos con fracciones de la proteína dirigidos a la partícula viral completa, y mediante ensayos de aglutinación determinar la reactividad de los mismos (Guiping *et al*; 2010). Sin embargo, son pocos los estudios que han caracterizado las funciones de los dominios de la proteína, entre ellos están los ensayos realizados por Zhirnov en el 1999, donde se le atribuye a M1 interacciones con caspasas anti-apoptóticas, esto debido al exceso de cargas positivas por el número de

Argininas que están presentes en la proteína, de manera que estas interactúan con el RNA viral y las membranas de los fosfolípidos cargados negativamente (Zhimov *et al.*, 1999).

Anteriormente se han realizado análisis antigénicos y de localización intracelular con anticuerpos monoclonales dirigidos a la proteína fraccionada, y debido a ensayos *in vivo* con ratones, se ha demostrado que los anticuerpos dirigidos contra M1 confieren una inmunidad efectiva contra el virus, esto debido a que los anticuerpos afectan la interacción de M1 con el complejo ribonucleoproteico, con lo cual evitan la liberación del RNA viral al citoplasma de la célula hospedera (Bucher *et al.*, 1989).

Ensayos dirigidos a identificar los inmunodominios de la proteína de matriz (Noton *et al.*, 2007, Ali A *et al.*, 2000, Zhiping *et al.*, 1999) han demostrado que la respuesta inmune protectora que se genera por los anticuerpos es debido a que estos intervienen con la funcionalidad de estructuras específicas de la proteína, tales como el dedo de zinc (Del aminoácido 148 al 162), así como del palíndromo de localización nuclear presente en el aminoácido 101 al 105 (RKLKR). Estas secuencias y estructuras son esenciales para el funcionamiento óptimo de la maquinaria viral. Zhiping realizó diversas investigaciones donde caracterizó los dominios de la proteína y estudió las interacciones que se llevan a cabo para el ensamblaje y liberación del complejo ribonucleoproteico: RNA – Proteína (M1) y Proteína (NP) – Proteína (M1). Estas interacciones hidrofóbicas mantienen la integridad la proteína y la partícula viral completa. Utilizando mutagénesis sitio dirigida, donde se realizaban cambios estructurales drásticos en la secuencia aminoacídica que comprende estas estructuras, se observó que el funcionamiento de la proteína se comprometido de manera significativa alterando la infección de la partícula viral completa (Zhiping *et al.*, 1999).

2.7 Variabilidad genética

Debido a la diversidad de funciones que desempeña M1, las mutaciones puntuales presentes en alguna región específica del gen que codifica para la misma pueden conferirle características distintas. Se ha observado, que un solo aminoácido puede incluso alterar sus características antigénicas, alterando el reconocimiento por anticuerpos específicos contra epitopes presentes en la proteína (Zhiping *et al.*, 1986). Sin embargo, para comprender su rol en la infección de la célula diana, es necesario estudiar la estabilidad

conformacional que mantiene M1 en cepas procedentes de diferentes hospederos, realizar el análisis de las mutaciones presentes en la misma, y detectar los cambios que puedan estar involucrados en el *drift* antigénico.

Cuando una célula es infectada por dos o más virus de influenza distintos, los segmentos de RNA pueden reagruparse al azar resultando en la emergencia de un subtipo de virus influenza diferente, a este fenómeno se le denomina *Shift* antigénico. En cambio, el *Drift* antigénico, es aquél que se presenta cuando existe una acumulación de mutaciones puntuales que le confieren al virus una capacidad antigénica diferente. Estos cambios genéticos que producen cambios antigénicos son los que le confieren al virus esta capacidad de evadir la respuesta inmunológica y por consecuencia producir una enfermedad emergente. En un estudio realizado por Guarnaccia y colaboradores donde analizaron secuencias del gen de matriz de la cepa pandémica del 2009 (H1N1), observaron que el cambio de dos aminoácidos, indujeron una falta de reconocimiento significativa de anticuerpos anti-M1 (Guarnaccia *et al.*, 2013).

2.8 Actividad neutralizante de anticuerpos anti-M1

Pese a que el virus de la influenza A/H1N1/2009 tuvo un gran impacto de morbilidad y mortalidad en la población de seres humanos en la pasada pandemia del 2009, son pocos los reportes que han expresado de manera recombinante la proteína M1 de esta cepa. En estos estudios se da a conocer la participación de esta proteína en la patogenicidad del virus en los humanos, donde se han utilizado los antígenos de superficie y la proteína de matriz para producir anticuerpos neutralizantes.

Asimismo, Zhiping realizó ensayos de neutralización viral en modelos *in vivo* mediante la producción de anticuerpos monoclonales dirigidos a dominios estructurales específicos de M1 de la cepa WSN/33. A través de ensayos de unión competitiva y Western blot, se obtuvieron valiosos resultados, donde se observó que hasta un 67% de la infección se vio disminuida por la neutralización de M1 por anticuerpos monoclonales (Zhiping *et al.*, 1986).

3. JUSTIFICACIÓN

Factores que intervienen con la patogenicidad del virus tales como su distribución por aves silvestres, la tasa de error de la polimerasa y la transmisión directa entre especies son determinantes en la emergencia del virus Influenza A. Por ello es necesario ampliar estudios que caractericen la variabilidad genética y antigénica de elementos más estables del virus. El uso de proteínas conservadas que generen una respuesta cruzada de anticuerpos, puede ser una estrategia atractiva para determinar los epítopes responsables de inducir una respuesta neutralizante. Además, el identificar las mutaciones presentes en los epítopes de neutralización de M1 podría ampliar las alternativas de control del virus influenza A.

4. HIPÓTESIS

Epítopes de neutralización del gen M1 del virus Influenza A presentan variabilidad genética y antigénica entre muestras de equinos y caninos del estado de Nuevo León, México.

5. OBJETIVO DEL TRABAJO

El presente trabajo de investigación tiene como objetivo determinar las mutaciones presentes en los epítopes de neutralización de la proteína M1 del virus Influenza A de equinos y caninos del estado de Nuevo León, México.

5.1 Objetivos Particulares

- 1) Determinar la variabilidad genética de la región codificante del gen 7 del virus Influenza A en equinos y caninos del estado de Nuevo León.
- 2) Determinar la seroprevalencia del virus Influenza A en las poblaciones de caballos transportadores de residuos y perros callejeros de Nuevo León.
- 3) Evaluar la capacidad neutralizante de los anticuerpos policlonales obtenidos frente a las cepas de campo adaptadas a cultivo celular.
- 4) Determinar las mutaciones presentes en los epítopes de neutralización de la proteína M1 del virus Influenza A de equinos y caninos del estado de Nuevo León.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Comité de ética

Todos los experimentos con animales fueron aprobados por el Comité de Ética de Investigación y Bienestar Animal (CEIBA-2018-024) de la Facultad de Ciencias Biológicas (FCB), Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL) y se realizó el muestreo bajo las indicaciones de la NOM-062-ZOO-1999. Se obtuvo el consentimiento informado de los propietarios de los animales para la recopilación de información adicional.

6.2 Área de estudio y muestreo

Las muestras se obtuvieron durante el período marzo del 2013 - diciembre de 2015. Las muestras obtenidas provienen de 9 municipios (Apodaca, Cadereyta Jiménez, Escobedo, Guadalupe, Juárez, Montemorelos, Monterrey, San Nicolás de los Garza y Zuazua) de Nuevo León, México. La Facultad Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ), UANL realizó el muestreo durante la consulta voluntaria de perros domésticos con cuadro respiratorio agudo. De esta población canina, se obtuvieron 58 hisopados nasales, 5 necropsias pulmonares y 5 hisopados oculares. Para el estudio de seroprevalencia en perros, se recolectaron 123 muestras de perros en condición de calle provenientes del Centro antirrábico de los municipios Guadalupe y Juárez, Nuevo León. Ninguno de los perros analizados presentaba antecedentes de viaje y ninguno había sido vacunado contra el virus de Influenza A. A través de brigadas de vacunación por parte de la FMVZ, se colectaron 123 muestras de suero y 8 hisopados nasales de caballos transportadores de residuos. Los hisopados y las necropsias se mantuvieron en medio MEM adicionado con 2% de antibiótico-antimicótico Gibco® (Thermo fisher scientific, Massachusetts, EE. UU.) y se almacenaron a -70 ° C hasta su uso. Se obtuvieron muestras de sangre periférica a través de punción venosa y se centrifugaron a 3,000 rpm para obtener el suero, que se almacenó a -20 ° C hasta su uso.

6.3 Colección de muestras

Las muestras utilizadas para la obtención del ARN viral fueron: necropsias pulmonares de caninos, hisopados nasales de equinos y caninos e hisopados oculares de caninos. Para la propagación de partículas virales en cultivo de células, se utilizaron los hisopados nasales de equinos transportadores de residuos. Para el análisis de seroprevalencia y neutralización viral, se utilizaron 123 sueros de caballos transportadores de residuos y 123 sueros de perros en condición de calle.

6.4 Aislamiento de ARN viral y amplificación del gen 7 de matriz

El ARN viral se purificó a partir de necropsias de pulmón, hisopados nasales y oculares utilizando el kit AxyPrep™ Body Fluid Viral DNA/RNA Miniprep Kit (AxygenBioscience, Union city, USA) siguiendo el protocolo del fabricante. La región amplificada del gen M1 de 756 pb se obtuvo a través del sistema SuperScript® III One-Step RT-PCR system with Platinum® Taq High Fidelity (Thermo fisher scientific, Massachusetts, USA) utilizando oligonucleótidos específicos que flanquean la región codificante de M1 (5'-CACGGATCCAAGATGAGTCTTCTAACCGAC-3' y 5'-CACGTCGACAGGATCACTTGAATCGCTGCA-3'). Posteriormente, se realizó una segunda PCR utilizando oligonucleótidos recomendados por la Organización Mundial de la Salud (OMS) para la detección del virus de la Influenza A (5'-ATGAGYCTTYTAACCGAGGTCGAAACG-3' y 5'-TGGACAAANCGTCTACGCTGCAG-3') obteniendo un producto de PCR de 244 pb. Como controles de amplificación se utilizaron las vacunas Fluvac Innovator Pfizer Equine Influenza Vaccine (A2 / Kentucky / 97) y Vanguard Plus 5 L4 Vaccine aqmbas utilizadas en la población equina y canina contra agentes respiratorios. El producto de amplificación se visualizó en un gel de agarosa al 1,5% y luego se secuenciaron para confirmar su identidad genética.

6.5 Análisis de mutaciones y árbol filogenético

Los productos del tamaño esperado (244 pb) se purificaron utilizando el kit Wizard® SV Gel and PCR clean-up system (Promega, Wisconsin, USA) y se secuenciaron directamente mediante un sistema automatizado (Perkin Elmer / Applied Biosystem,

California, EE. UU.) en el Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México (IBT-UNAM). El análisis de secuencias se realizó utilizando la herramienta de alineamientos de CLUSTAL W/BioEdit v7.0 (Hall et al., 1999) y el software MEGAX (Kumar et al., 2018). Las secuencias parciales de M1 obtenidas en este estudio fueron cargadas a la base de datos del GenBank con los números de acceso MH463596, MH463597, MH463598, MH463599, MH463600, MH463601 y MH463602. El árbol filogenético contiene secuencias correspondientes al gen de la matriz M1 del virus de la influenza A obtenido de la plataforma Influenza Virus Resource (NCBI) database. Reordenamientos zoonóticos: MK690088, CY050848, MG254077, MU471689; Aislamientos contemporáneos: AY737298, HQ237603, MF173290, MH363692, MK690096 y Cepas Ancestrales de CIV y EIV: CY109269, GU433346, DQ124160, CY067361, DQ222916, CY028837, Outgroup: CY125948 y KR077935 y KR07777. Se utilizó el modelo de máxima probabilidad Jones-Taylor-Thornton (JTT) para la construcción del árbol filogenético.

6.6 Proteína de matriz M1 recombinante

Se procesó una muestra de heces de un ave silvestre positiva para el virus de la Influenza A (Proporcionada por el Dr. José Ignacio González Rojas del Laboratorio de Ornitología, Facultad de Ciencias Biológicas, UANL) para obtener la secuencia codificante del gen M1. La secuencia obtenida posee una identidad del 100% con el gen matriz presente en el subtipo H1N1/2009. Esta secuencia se subclonó en el vector de expresión pET-28a (+) (Promega, Wisconsin, EE. UU.). La expresión de proteínas se realizó en bacterias *E. coli* BL21 competentes y la inducción se llevó a cabo por IPTG 1mM. Se tomaron bacterias con una densidad óptica de 0,4 OD (600 nm) antes de la inducción como control negativo. Posteriormente, se indujo la expresión y después de 5 horas de incubación, el extracto de proteína fue cosechado con una DO de 1,6. La lisis bacteriana se realizó mediante lisozimas y sonicación. La purificación se realizó a través de columnas de afinidad HisTrap™ HP (GE Healthcare, EE. UU.) en condiciones desnaturizantes con urea (4M). La cuantificación de las fracciones proteicas purificadas se realizó mediante un método semicuantitativo-cualitativo que compara la intensidad de las bandas observadas en el SDS-Page, utilizando fracciones de albúmina bovina como control. La proteína

purificada se analizó mediante Western blot para confirmar su identidad usando un anticuerpo monoclonal contra la proteína M1 del virus de la gripe (Abcam, Reino Unido).

6.7 Anticuerpos policlonales

Conejos blancos Nueva Zelanda se inmunizaron por vía subcutánea con 1 mg de proteína de matriz recombinante en 6 puntos diferentes. Para la inmunización primaria se administró el antígeno con adyuvante completo de Freund. Para las inmunizaciones de refuerzo, se administraron 0,5 mg de proteína con el adyuvante incompleto de Freund después de 15 días de la inmunización primaria y una vez más 2 semanas después (Leenaars y Hendriksen, 2005). Se colectó el sangrado final 15 días después de la inmunización final y se obtuvo suero. Las condiciones de protección animal fueron seguidas por NOM-062-ZOO-1999.

6.8 Seroprevalencia a través de ELISA HADAS

Se sensibilizaron placas de microtitulación se revistieron con anticuerpos de perros/caballos diluidos en buffer carbonato-bicarbonato pH 9,6 y se incubaron durante la noche a 4°C. Después de dos lavados con PBS, las placas se bloquearon con leche en polvo sin grasa al 5% diluido en PBS y se incubaron a 37°C durante 1 h. Después de dos lavados, se agregó la proteína de matriz recombinante a una concentración de 40 µg/ml y se incubó a 37°C durante 1 h. El anticuerpo anti-M1 (1:7,000) producido en conejo se añadió y se incubó a 37°C durante 1 hora. Se realizaron dos lavados más y se añadió la proteína A conjugada con peroxidasa-HRP (Amersham, Buckinghamshire, Reino Unido) y se incubó a 37 ° C durante 1 h. Se realizaron dos lavados más y se añadió el sustrato de peroxidasa ABTS (2,2'-azino-bis [ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico]) (KPL, Gaithersburg, MD, EE. UU.) y se incubó a 37°C durante 30 minutos. La absorbancia a 405 nm se midió utilizando un lector automático de microplacas (Digital y Analog Systems, Roma, Italia). Se utilizó suero humano positivo para Influenza H1N1/2009 y suero fetal bovino como control positivo y negativo, respectivamente. El valor de corte se definió como la media de los valores negativos de control OD 405 nm más tres desviaciones estándar.

6.9 Adaptación de cepas de campo de Influenza A en línea celular VERO

Se tomó una alícuota de las suspensiones del fluido nasal de caballo y se depositó en un tubo cónico de 1.5 ml y se centrifugó a 12,000 rpm para obtener el sobrenadante. Se añadió 2 μ l antibiótico-antimicótico obteniendo una concentración final de 50 μ g/ml. Posteriormente se filtró el sobrenadante con un filtro de 0.45 micras. Se procedió a realizar la activación del virus con 1 μ l de Tripsina 1% y se incubó a 37°C por 30 minutos. Se retiró el medio de cultivo de un frasco F25 con células VERO confluentes y se realizaron lavados de la monocapa con PBS A 1X. Se añadió el virus y se agitó el frasco suavemente durante 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se añadió 2 ml de medio de cultivo D-MEM sin suero y se incubó a 37°C a una atmósfera de 5% de CO₂ hasta observar efecto citopático. Los lisados fueron cosechados alternando incubaciones a 37°C y -20°C en baño maría para desprender las células del frasco. Como control de propagación e infección del virus, se activaron 300 μ l de la vacuna (*Virus atenuado Pfizer Fluvac Innovator*) con 1 μ l de Tripsina 1%. Se incubó durante 30 minutos a 37°C y se siguió la metodología ya mencionada.

6.10 Cuantificación de partículas virales a través de Unidades Formadoras de Placa (UFP)

Utilizando la misma línea celular se prepararon placas de 6 pozos con 1×10^6 células cada uno. Alcanzando una confluencia de 80 – 90% se realizó el lavado de las monocapas con PBS 1X. Se realizaron diluciones seriadas del lisado obtenido de los aislamientos de campo en un rango de 10^{-2} to 10^{-7} en medio MEM sin SFB y HEPES 1% con 20 μ g/ml de tripsina. Cada pozo fue infectado con 500 μ l de cada dilución y se incubó a 37°C por 1 hora. Después se retiraron los remanentes de la infección viral y se añadieron 4 ml de Agarosa 1X (Agarosa al 1%, diluida en MEM Tripsina 20 μ g/ml) sobre los pocillos infectados. Se dejó solidificar durante 20-30 minutos. Las placas fueron incubadas a 37°C a 5% de CO₂ por 48-72 horas. Una vez que las placas fueron visibles se removió cuidadosamente la capa de agarosa. Finalmente realizó una tinción de las células con una solución de cristal violeta al 0.5%. Los títulos de las placas fueron determinados como *Unidades Formadoras de Placa (UFP) por mililitro*.

6.11 Cuantificación de partículas virales a través de Unidades Formadoras de Foco (UFF)

El protocolo de tinción con Inmunoperoxidasa descrito por Arias y colaboradores (Arias et al., 1987) se realizó de la siguiente manera: Se tomó una alícuota de 350 µl de lisado celular infectado con la cepa de vacunal A2/Equine/Kentucky/97 la cual fue previamente activada con 1 µl de tripsina 1% (20µg/ml concentración final) incubándose 30 min a 37°C. Posteriormente en una placa de 96 pozos estéril, se preparó por duplicado 200 µl de las diluciones: 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64 y 1:128 del virus activado en MEM sin suero. Se lavó dos veces una placa de 96 pozos con células VERO con un 90% de confluencia, con 200 µl de PBS A 1X y después se adicionó 50 µl de cada dilución del virus. También se incluyeron 2 pozos con 50 µl del virus concentrado (sin diluir). Las células fueron incubadas a 37°C por una hora. Se retiró el virus activado y se lavó una vez con 200 µl de PBS 1X, después se adicionó 150 µl de MEM sin suero. La placa se incubó a 37°C por 14 horas. Al término de esta incubación, se retiró el medio de cultivo, se lavó una vez con 200 µl de PBS A 1X, y se fijaron las células a la placa de plástico adicionando 100 µl de Acetona 80%-PBS 5X, incubando 40 minutos a temperatura ambiente (condiciones sin esterilidad). Posteriormente se lavaron 2 veces con 200 µl de PBS 1X y se adicionaron 75 µl de anticuerpo anti-M1 pandémica producido en conejo de 30 días p.i. diluido 1:100 en PBS 1X. La placa se incubó a 37°C por una hora. Se retiró el anticuerpo y se lavó 2 veces con 200 µl de PBS 1X, para adicionar 75 µl de Proteína A-HRP (Amersham) diluida 1:500. Se incubó a 37°C por una hora. Posteriormente, se lavó 2 veces con 200 µl de PBS A 1X y se adicionaron 75 µl de Carbazol (Sigma-Aldrich). La placa se incubó a 37°C por 15 minutos en oscuridad y la reacción enzimática se detuvo lavando la placa con agua corriente 5 veces. El título de unidades formadoras de focos infecciosos se determinó en las diluciones donde se contaron entre 100 y 200 focos. El número de UFF/ml fue determinado con la siguiente fórmula:

$$\text{UFF/ml} = 20 \times 5.5 \times \text{Promedio de focos} \times \text{dilución}$$

Donde:

20 = Objetivo 20X del microscopio invertido

5.5 = Diámetro (mm) de un pozo de la placa 96 pozos

Promedio = Se obtiene un promedio del número de focos de los dos pozos de cada dilución

Dilución = Dilución donde se contará de 100-200 focos infecciosos

6.12 Ensayo de neutralización viral con anticuerpos de campo y anti-M1 recombinante

Se activó una alícuota de las cepas a determinar considerando el título de UFF/ml del virus y el número de sueros a analizar. Por cada mililitro de lisado con virus se adicionó 1µl de tripsina al 1%, incubándose a 37°C por 30 min. Posteriormente se realizaron diluciones del suero: 1:25, 1:50, 1:100, 1:200, 1:400 y 1:800 por duplicado en una placa de 96 pozos utilizando MEM sin suero. Por cada 50 µl de dilución del anticuerpo, se mezclaron 50 µl del virus activado y diluido a una concentración final de 100-200 UFF/ml. La mezcla virus-anticuerpo se incubó a 37°C por 1 hora. Después una placa de 96 pozos con células MA-104, fue lavada dos veces con 200 µl PBS 1X, y después se adicionaron 50 µl de la mezcla virus-anticuerpo. Como control negativo, se utilizaron 2 hileras de 8 pozos donde sólo se adicionaron 50 µl de virus activado y diluido (100-200 UFF/ml). La placa se incubó 37°C por 1 hora. Después se retiró la mezcla virus - suero, y se realizó un lavado con 200 µl de PBS 1X, después se adicionaron 150 µl de MEM sin suero. La placa se incubó a 37°C/5% CO₂ por 14 hrs. Al término de este tiempo, las células fueron teñidas con la técnica de inmunoperoxidasa descrita en la microtitulación de focos infecciosos. El título de anticuerpos neutralizantes se determinó utilizando el siguiente criterio (Arias *et al.*, 1987):

- a) Contar el número de focos infecciosos en los pozos control negativo.
- b) Calcular el promedio de focos y obtener el número de focos infecciosos correspondientes al 60% (corte).
- c) Contar el número de focos infecciosos en los pozos con las diluciones del suero, hasta llegar a la dilución donde el número de focos sea igual al 60% de focos.
- d) El título de anticuerpos neutralizantes se reporta utilizando el recíproco de la dilución donde existió el 60% de neutralización de focos infecciosos.

6.13 Análisis de epítopes neutralizantes de la proteína M1 del virus Influenza A

Para el análisis de epítopes neutralizantes se utilizará la plataforma de predicción de epítopes IEDB Analysis Resource (<https://www.iedb.org/>) y la herramienta bioinformática BioEdit v7.0 (Hall et al., 1999).

7. RESULTADOS

Equinos y caninos con cuadro respiratorio agudo fueron analizados para determinar la presencia del virus Influenza a través de la amplificación del gen de matriz M1. La obtención de muestras se llevó a cabo durante el período marzo 2013 – diciembre 2015 de 9 municipios del estado de Nuevo León (Tabla 1).

7.1 Amplificación del gen 7 de matriz del virus Influenza A

Del total de muestras analizadas, el gen de la matriz se amplificó en 13 (19.11%) hisopados nasales, 2 (2.94%) hisopados oculares y 5 (7.35%) necropsias pulmonares, dando un total de 20 (29.41%) muestras positivas en la población de caninos (Tabla 1). Por su parte, de la población de equinos analizados se amplificaron 6 (75%) muestras positivas al gen de matriz (Tabla 2).

Table 1. Colección de muestras de caninos utilizadas en la detección del gen de matriz del virus Influenza A del estado de Nuevo León.

Tipo de muestra	Municipios	Número de muestras	Número de positivos (%)
Hisopado nasal	Monterrey	4	2 (15.38)
	Escobedo	13	6 (46.1)
	San Nicolás de los Garza	32	3 (23)
	Apodaca	6	1 (7.6)
	Guadalupe	3	1 (7.6)
Hisopado ocular	San Nicolás de los Garza	3	1 (20)
	Apodaca	2	1 (20)
Necropsia de pulmón	ND	5	5 (100)

*ND: No determinado.

Table 2. Colección de muestras de equinos utilizadas en la detección del gen de matriz del virus Influenza A del estado de Nuevo León.

Tipo de muestra	Municipios	Número de muestras	Número de positivos (%)
Hisopado nasal	Montemorelos	1	1 (16)
	Cadereyta	5	4 (50)
	Monterrey	1	0
	San Nicolás de los Garza	1	1 (16)

7.2 Análisis de secuencia del gen de la matriz.

Se realizó la secuenciación de los productos de PCR obtenidos con un tamaño estimado de 244 pb correspondientes a la secuencia parcial del gen de la matriz M1 de muestras caninas y equinas. Los alineamientos de nucleótidos de las secuencias analizadas mostraron una identidad del 96-99% con secuencias del gen M1 del virus de la Influenza A (Tabla 3).

Tabla 3. Análisis de identidad de las secuencias obtenidas durante el estudio utilizando la herramienta BLAST del NCBI.

Hospedero	ID NCBI	% Identidad (nt)	% Identidad (aa)
Canino	MH463596	99.53	100
Equino	MH463597	99.53	100
Canino	MH463598	98.59	94.37 -100
Canino	MH463599	96.24 - 96.71	94.37
Canino	MH463600	97.65 - 98.12	94.37 - 97.18
Equino	MH463601	96.24 - 96.71	94.37
Equino	MH463602	98.56 - 99.06	98.59

Estos aislamientos se compararon con secuencias parciales del gen de matriz de cepas representativas del clado 1 del linaje americano del virus Influenza (Florida): A/eq/Miami/63, A/eq/Wisconsin/03 y A/canine/Colorado/06, presentando mutaciones nucleotídicas (Figura 1) y aminoacídicas (97.18 - 99.15% identidad) (Figura 2). Esta comparación mostró variabilidad genética en la región codificante del gen M1 entre los aminoácidos 10 a 80 (Figura 3), observando una mayor variabilidad genética en las secuencias caninas que en las secuencias equinas.

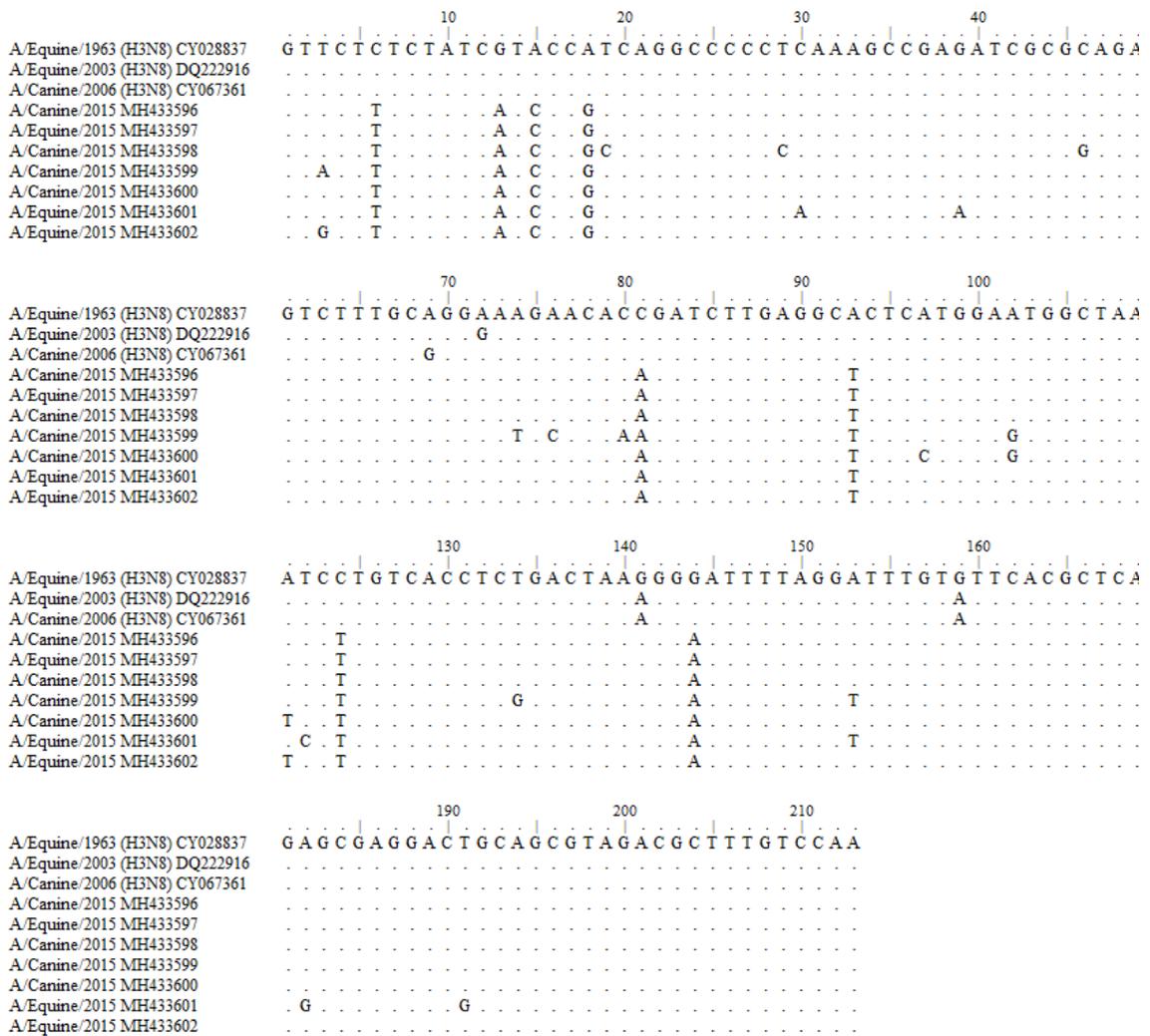


Figura 1. Alineamiento de secuencias nucleotídicas parciales de M1 con secuencias de cepas del linaje americano.

El análisis filogenético de las secuencias muestra proximidad con el gen de matriz presente en cepas zoonóticas y potencialmente pandémicas tales como los subtipos H3N2, H1N2 y H1N1/2009.

Las secuencias de caninos obtenidas en este estudio presentaron proximidad genética con el gen de matriz presente en cepas aisladas de humano y cerdo en aislamientos que datan del 2009 al 2018. Los subtipos donde predominaron estas secuencias fueron H1N1, H1N2 y H3N2 (Figura 4). Por su parte las secuencias de equinos presentaron una proximidad genética mayor con secuencias humanas y de cerdo del subtipo H1N1 y H3N2 (Figura 5).

Para determinar la divergencia genética en la secuencia parcial obtenida de las muestras estudiadas, se incluyeron secuencias de origen equino, canino que involucraban cepas ancestrales, contemporáneas y zoonóticas. En este análisis, se evidencia cómo las secuencias obtenidas en este estudio poseen una identidad genética del 95.78-97% con secuencias de matriz de aislados de H3N2 y H1N1 obtenidos de gatos domésticos, así como secuencias de matriz de presentes en la cepa pandémica H1N1/2009 de cerdos y humanos (Reordenamientos zoonóticos). Los aislados mexicanos también tienen una identidad del 92.96-98.6% con cepas contemporáneas aviarias, equinas y caninas. Las secuencias parciales del gen M de las cepas ancestrales H3N2 y H3N8 de CIV y EIV se obtuvieron de Genbank, obteniendo una identidad de 91.55-97.19% (Figura 6).

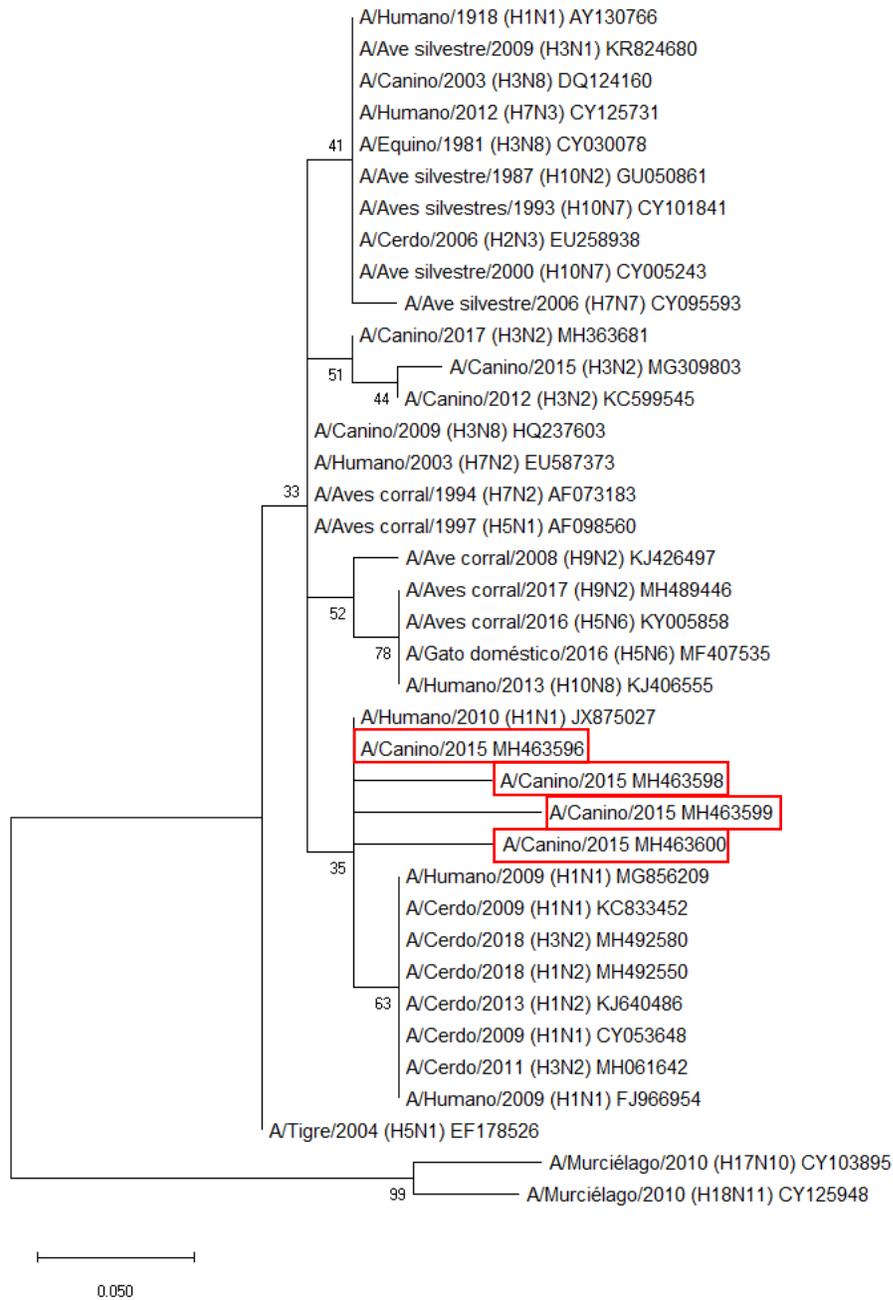


Figura 4. Análisis filogenético de secuencias deducidas de aminoácidos de la proteína M1 de aislamientos de caninos de Nuevo León, México. El árbol fue construido utilizando el método *Neighbor joining*, con un bootstrap de 1,000 réplicas (MEGAX).



Figura 5. Análisis filogenético de secuencias deducidas de aminoácidos de la proteína M1 de aislamientos de equinos de Nuevo León, México. El árbol fue construido utilizando el método *Neighbor joining*, con un bootstrap de 1,000 réplicas (MEGAX).

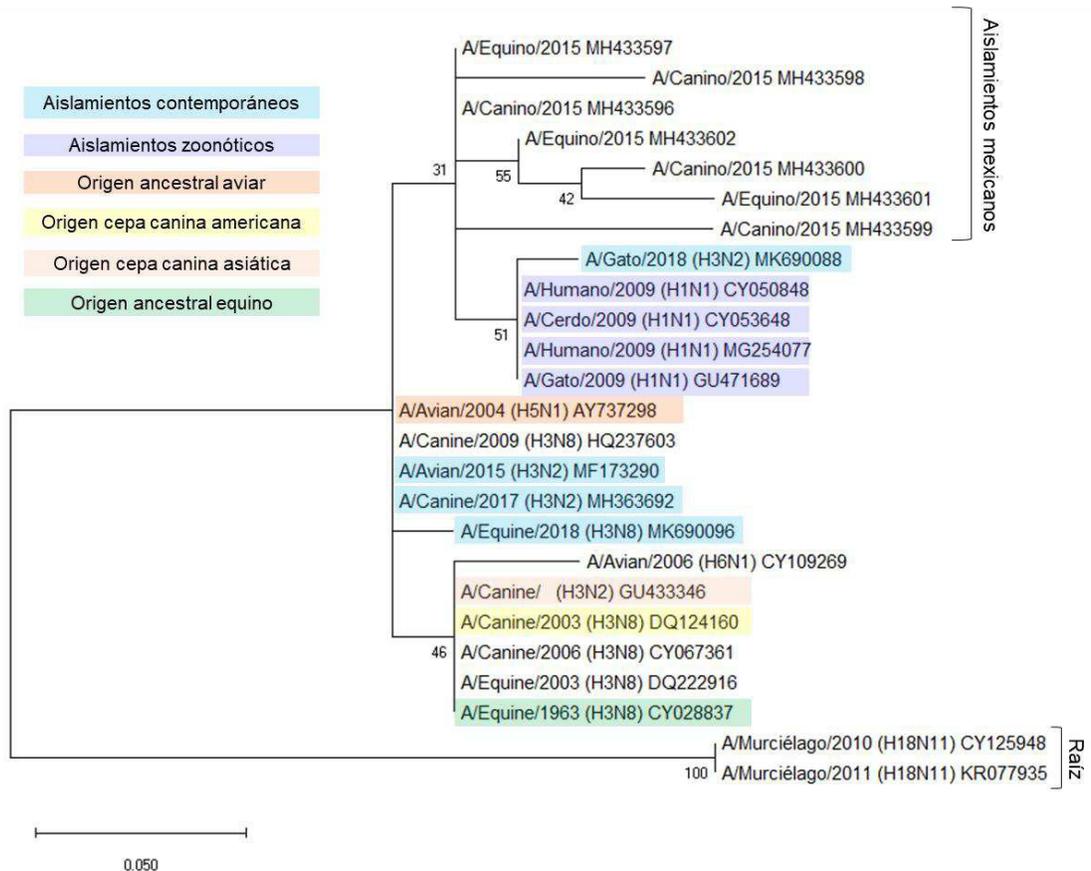


Figura 6. Análisis filogenético de secuencias deducidas de aminoácidos de la proteína M1 de aislamientos de equinos y caninos con secuencias zoonóticas y cepas ancestrales. El origen particular de las secuencias es diferenciado con colores. El árbol fue construido utilizando el método *Neighbor joining*, con un bootstrap de 1,000 réplicas (MEGAX).

7. 3 Seroprevalencia del virus Influenza A en equinos y caninos

Se realizó un análisis de seroprevalencia a través de un sistema de ELISA tipo HADAS probando un total de 123 sueros de caninos y 123 sueros de equinos obtenidos de 9 municipios del estado de Nuevo León. Para ello se determinó la presencia de anticuerpos dirigidos a la proteína de matriz M1 producida de manera recombinante (Figura 7). Para determinar la actividad antigénica de la proteína recombinante se realizó un ensayo de Western blot utilizando un anticuerpo comercial policlonal anti-M1 (Figura 8). De la población de caninos analizada se obtuvo un 100% (123) de seroprevalencia. Cabe mencionar, al menos el 21,46% de la población canina se había vacunado contra otros

agentes virales respiratorios. Mientras tanto, 114 (92,68%) de los equinos presentaron anticuerpos policlonales contra la proteína de matriz M1 del virus Influenza. Solo se mencionó la inmunización con el antígeno de toxoide tetánico en la población de caballos estudiada.

La población de caninos que resultó positiva para CIV tenía al menos tres síntomas predominantes: conjuntivitis, secreción nasal y estornudos (Tabla 4). La conjuntivitis y la secreción nasal se presentaron en el 27,94% de la población estudiada, mientras que se observaron estornudos en al menos 10 perros positivos para CIV. Los equinos informaron menos síntomas, entre los que predominan secreción nasal y estornudos, tanto en la población muestreada como en las muestras positivas para EIV (Tabla 5).

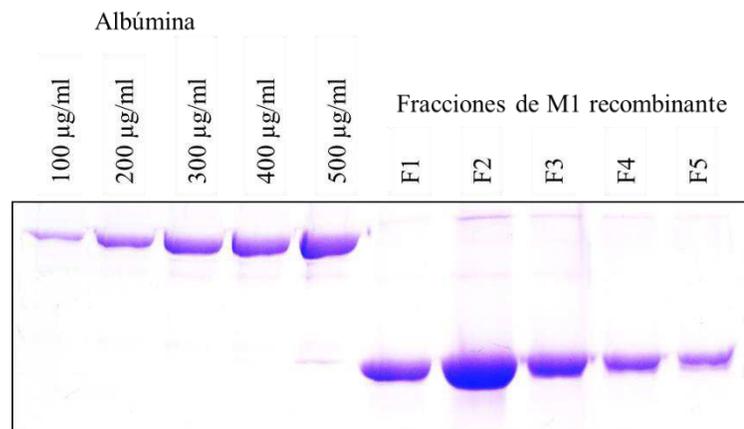


Figura 7. SDS-Page de proteína recombinante M1. Tinción con azul de comassie, el análisis semi-cuantitativo se realizó a través de concentraciones de albumina.

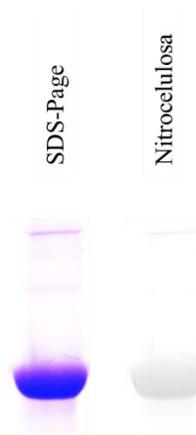


Figura 8. Análisis antigénico de la proteína recombinante M1 a través de un ensayo de Western blot utilizando un anticuerpo comercial.

Tabla 4. Síntomas predominantes en la población de perros muestreada.

Sintomatología	Número (%) de caninos con sintomatología reportada	Muestras positivas
		Caninos
Anorexia	18 (26.47)	10
Tos	28 (41.17)	11
Dificultad respiratoria	16 (23.52)	10
Fiebre	12 (17.64)	7
Conjuntivitis	39 (57.35)	19
Escurrecimiento nasal	34 (50)	13
Estornudos	20 (29.41)	11
Emesis	4 (5.88)	1

Tabla 5. Síntomas predominantes en la población de equinos muestreada.

Sintomatología	Número (%) de equinos con sintomatología reportada	Muestras positivas
		Equinos
Anorexia	2 (25)	2
Tos	4 (50)	3
Dificultad respiratoria	4 (50)	2
Fiebre	2 (25)	2
Conjuntivitis	Ausente	Ausente
Escurrecimiento nasal	8 (100)	6
Estornudos	7 (87.5)	3
Emesis	Ausente	Ausente

7.4 Propagación de aislamientos virales en cultivo de células

De las muestras obtenidas de hisopado nasal de equinos se realizó la propagación en la línea celular VERO (Figura 9), donde de manera eficiente se propagaron 4 aislamientos (Equino 1, Equino 2, Equino 3 y Equino 4) (Figura 10). A su vez, se propagó la cepa vacunal A2/Kentucky/97, correspondiente al virus atenuado de EIV utilizado como control positivo en el ensayo. Después de 9 a 12 pases de infección, los aislamientos disminuyeron su actividad lítica sobre la monocapa (Figura 11), además se realizaron ensayos de RT-PCR del gen M1 para evidenciar la propagación de EIV (Figura 12).

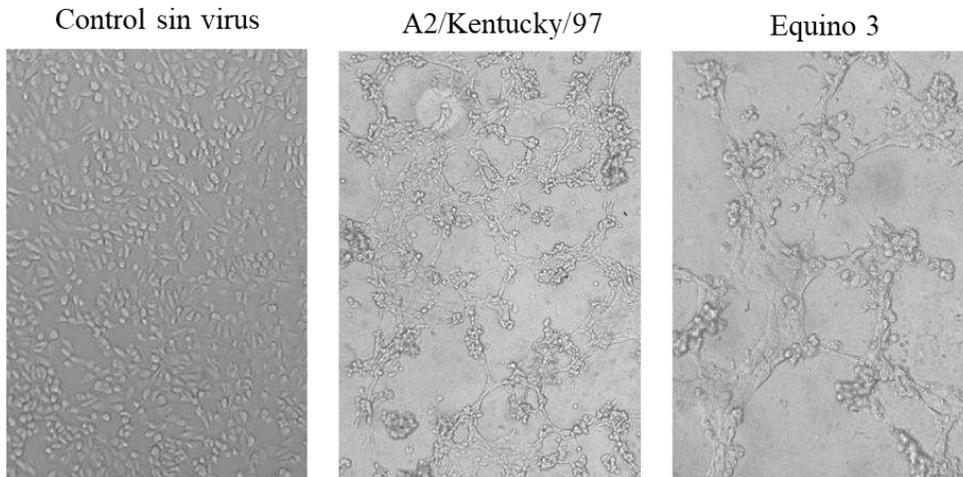


Figura 9. Propagación de aislamientos de campo en línea celular VERO.

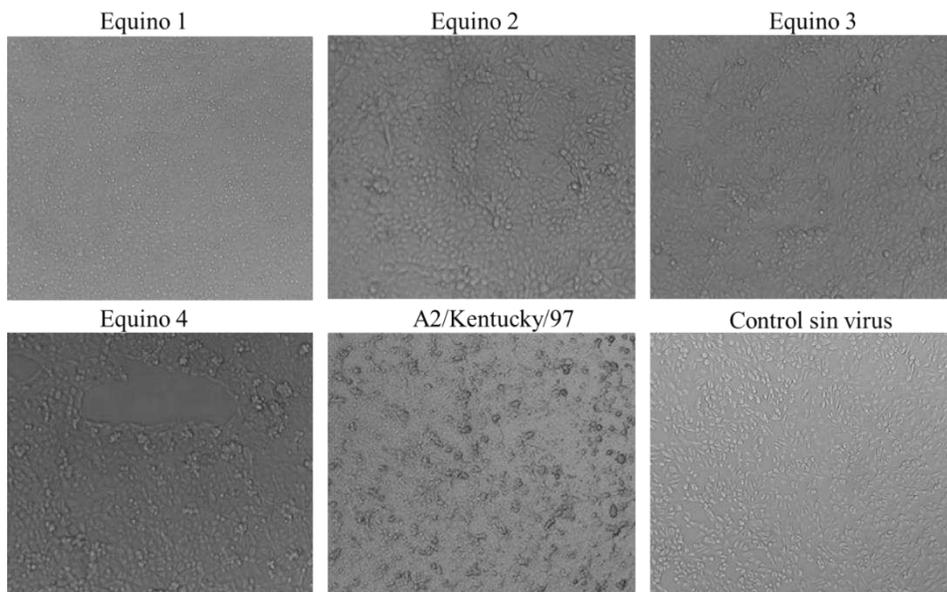


Figura 10. Actividad lítica sobre la línea celular VERO por aislamientos de equinos positivos a Influenza A virus.

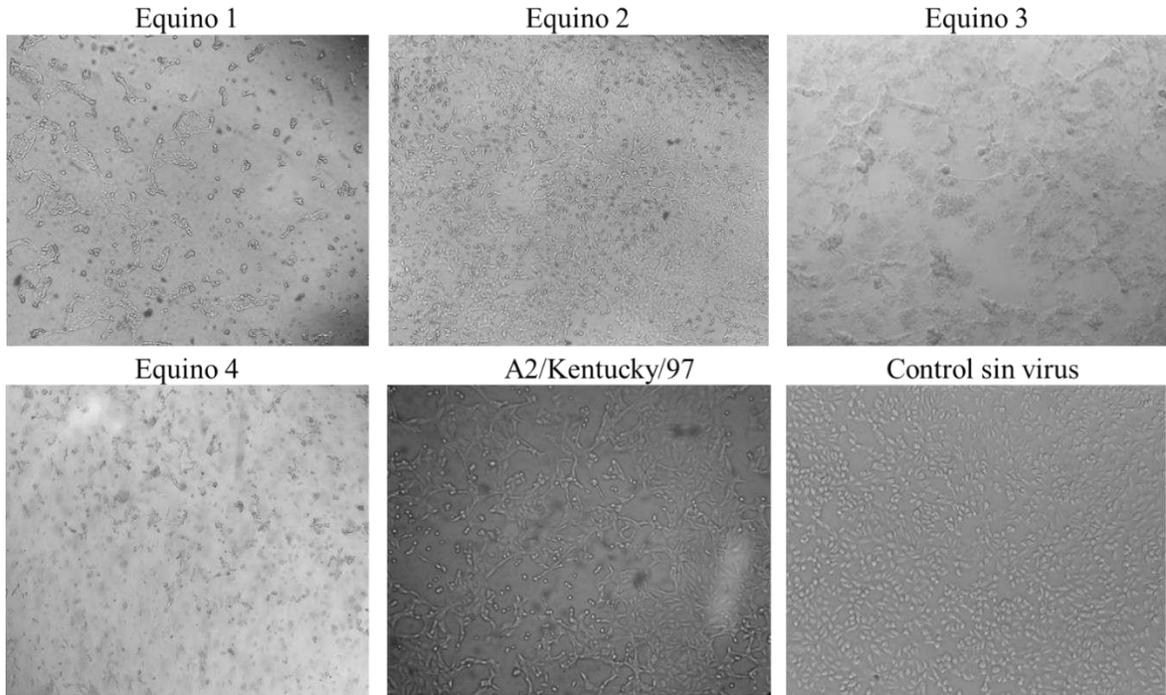


Figura 11. Efecto citopático sobre la línea celular VERO por aislamientos de equinos positivos a Influenza A virus.

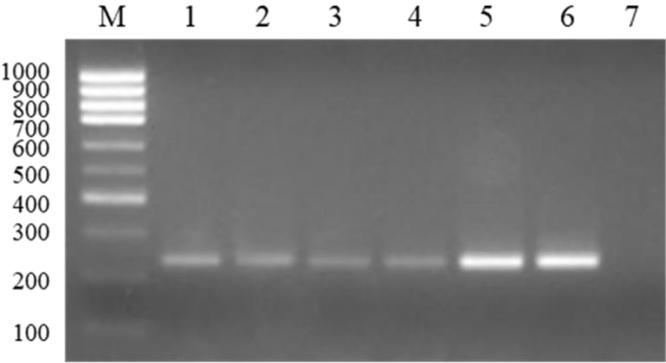


Figura 12. Ensayos de RT-PCR amplificando la región de 244 pb del gen de matriz durante la propagación de los aislamientos en cultivo celular.

7.5 Ensayos de cuantificación viral

Posterior a la propagación se realizó la cuantificación de partículas virales a través de UFF y UFP (Figura 13). Debido a la reproducibilidad de los ensayos, se optó por utilizar el método de UFF para los ensayos de neutralización (Figura 14). La cuantificación de UFP y de UFF se llevó a cabo a partir del 9no pase de infección.

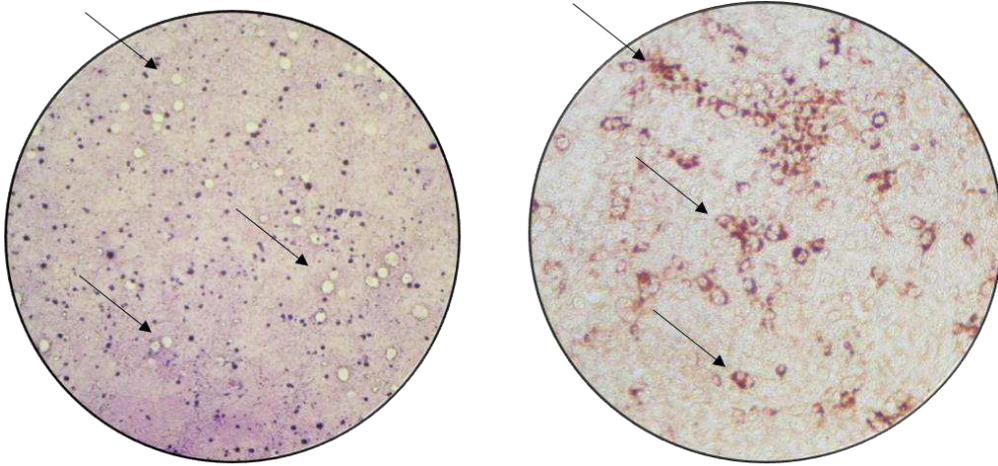


Figura 13. Ensayos de cuantificación viral por unidades formadoras de placas (UFP) y unidades formadoras de foco (UFF).

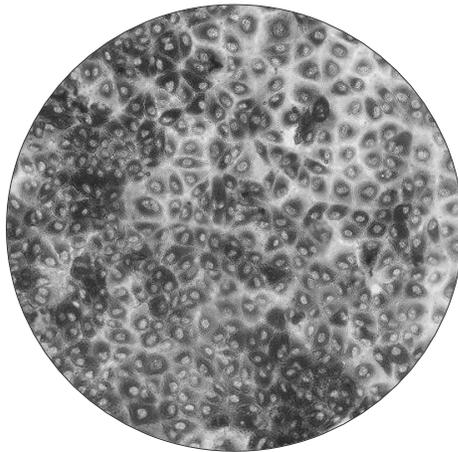


Figura 14. Ensayos de cuantificación viral por unidades formadoras de placas (UFP) y unidades formadoras de foco (UFF).

7.6 Ensayos de neutralización viral

Para determinar la actividad neutralizante, se utilizaron anticuerpos producidos por la inmunización con la vacuna, anticuerpos dirigidos a la proteína M1 recombinante y sueros obtenidos durante la colecta de muestras. Los anticuerpos que presentaron mejor actividad neutralizante fueron aquellos producidos por una infección natural presentando actividad neutralizante desde la dilución 150*-320*, le seguían anticuerpos policlonales producidos contra la proteína de matriz M1 80*-160* y finalmente anticuerpos producidos contra la vacunación 50*-80* (Figura 15; Tabla 6).

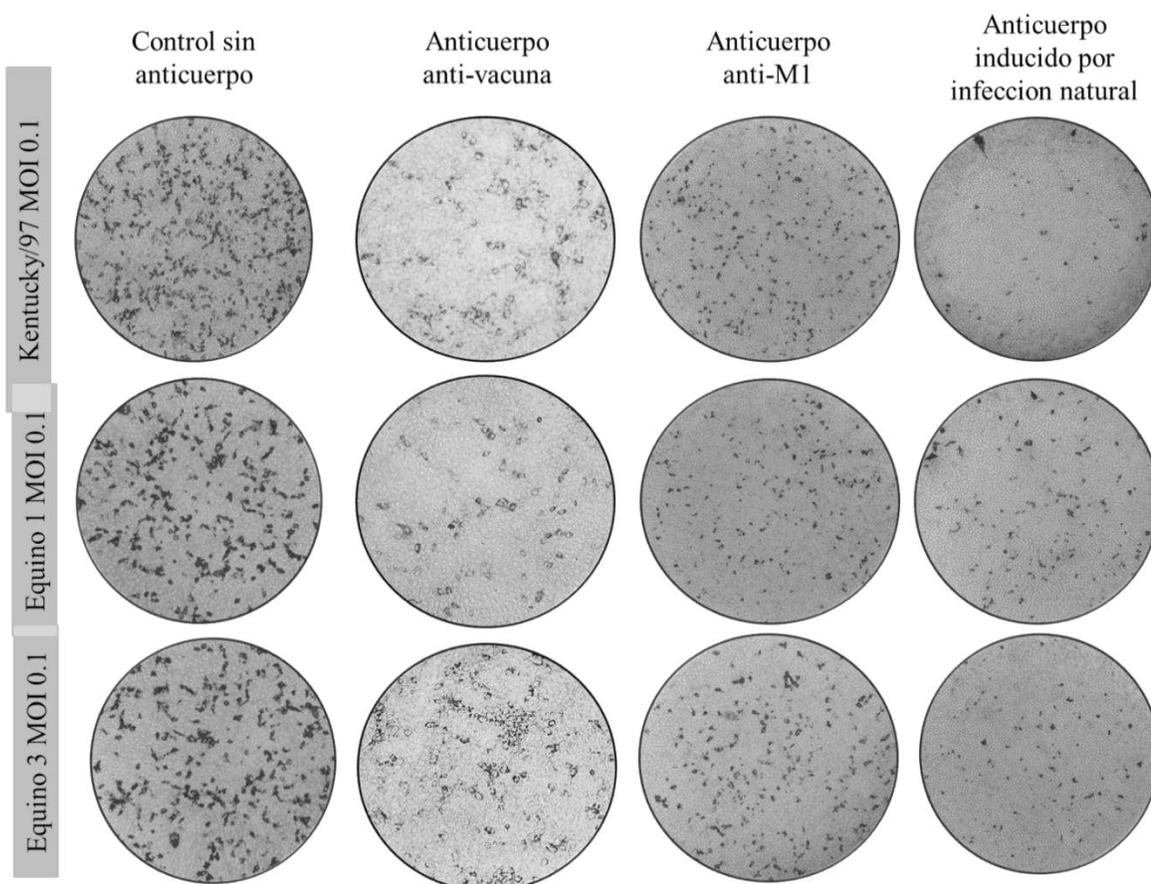


Figura 15. Ensayos de actividad neutralizante de anticuerpos de campo, anticuerpos anti-M1 y anticuerpos vacunales contra cepas de Influenza A propagadas en la línea celular VERO.

Tabla 6. Actividad neutralizante de anticuerpos y lisados obtenidos durante este estudio.

Virus	Anti-vacuna	Anti-M1	Anti-virus completo
A2/Kentucky/97	60*	80*	320*
Equino 1	80*	160*	320*
Equino 2	80*	160*	180*
Equino 3	50*	100*	150*
Equino 4	50*	100*	150*

*Recíproco de la dilución del suero donde existió 60% de reducción de focos infecciosos respecto a los controles **.

7.7 Determinación de mutaciones presentes en epítopes de neutralización de M1

Dentro del análisis de mutaciones presentes en la secuencia obtenida de M1 se realizó una predicción de epítopes para determinar la presencia de mutaciones que podrían comprometer la actividad neutralizante de los anticuerpos dirigidos a esos epítopes en particular (Tabla 7).

Posteriormente se seleccionaron secuencias ancestrales de la base de datos del NCBI para determinar secuencias consenso presentes en la proteína de matriz M1 en la población de aves y humanos. Comparativamente, las secuencias obtenidas de equinos presentan dos mutaciones: Q26R y D30S, mientras que en caninos se reportaron las mutaciones V15I y D30S. Esta última prevaleciendo en ambas especies animales (Tabla 8).

Tabla 7. Predicción de epítopes de la secuencia codificante de la proteína de matriz M1 utilizando la herramienta bioinformática *Epitope Prediction and Analysis Tools* de la *IEDB Analysis Resource*.

No.	Posición inicial	Posición terminal	Epítope	Tamaño	Especies
1	17	22	SGPLKA	6	
2	33	34	AG	2	
3	36	38	NTD	3	
4	69	74	PSERGL	6	Aves silvestres
5	84	94	LNGNGDPNNMD	11	Cerdos, aves silvestres
6	137	140	TVTT	4	Murciélagos
7	154	161	IADSQHRS	8	Cerdos y aves silvestres
8	164	168	QMATT	5	Aves silvestres
9	186	188	AKA	3	
12	191	207	QMAGSSEQAAEAMEVAN	17	Aves silvestres
13	220	229	GTHPSSSTGL	10	Cerdos, aves silvestres

Tabla 8. Secuencias consenso de aminoácidos presentes en el gen de matriz del virus Influenza A en aves, humanos, equinos y caninos. Las diferencias en las secuencias equinas y caninas están marcadas en rojo.

Posición	1	2	15	16	26	27	30	31	33	40	62
Consenso	M	S	V	P	Q	R	D	V	A	E	F
Aviar			I	S		K	S			G	
										D	
Humano		G	I					A	V		L
											C
Equino						R		S			
Canino			I					S			

8. DISCUSIÓN

A pesar de la amplia distribución del virus Influenza A alrededor del mundo, hasta ahora no se habían detectado virus de influenza canina (CIV) y equina (EIV) en México. Sin embargo, la presencia del virus en mascotas ya había sido reportada en otras partes del mundo aumentando su incidencia en animales domésticos (Payungporn et al., 2008; Song et al., 2008; Lee et al., 2010; Lin et al., 2015). En el presente estudio, se utilizaron 58 muestras de hisopado nasal, 5 necropsias de pulmón y 5 muestras de hisopados oculares de perros con un cuadro respiratorio agudo. La detección del virus Influenza A se realizó mediante la amplificación del gen de la matriz con los oligonucleótidos recomendados por la OMS. De ellos, 13 (19.11%) hisopados nasales, 5 (7.35%) necropsias de pulmón y 2 (2.94%) hisopos oculares de perros resultaron positivos. Aunque este valor es más alto que lo reportado en otros estudios, esto podría explicarse porque todos los animales muestreados presentaron síntomas clásicos de influenza y pertenecen a una población animal susceptible a enfermedades.

Las necropsias de pulmón analizadas previamente habían sido evaluadas para la detección de otros agentes respiratorios como Adenovirus canino tipo 2, el virus del moquillo canino y Parainfluenza canina. Estas coinfecciones podrían ser un factor importante en el desarrollo de enfermedades respiratorias graves que sufren los perros de compañía. La coinfección podría agravar la enfermedad e inducir la muerte prematura de los animales (Löhr et al., 2010; Kash et al., 2011; Metzger y Sun, 2013). La detección del gen de matriz a partir de muestras de hisopado ocular podría reforzar la hipótesis propuesta de que el virus utiliza la mucosa ocular como portal de entrada y como un sitio primario de replicación viral (Belser et al., 2018).

Seis (75%) muestras de hisopado nasal de caballos transportadores de residuos presentaron síntomas característicos del virus de la Influenza A y fueron positivos a la amplificación del gen de la matriz. Y aunque este porcentaje podría considerarse alto, un estudio reciente mostró que la detección de un 96% de muestras positivas a EIV en hisopos nasofaríngeos de equinos en Malasia durante un brote en 2015 (Toh et al., 2019).

Aunque hay muchos virus que infectan el tracto respiratorio y podrían inducir síntomas similares, en la actualidad, se han observado síntomas como conjuntivitis, secreción nasal y estornudos como los principales síntomas relacionados con la detección de CIV y EIV (Spickler, 2016; Singh et al., 2018). Estos síntomas estaban presentes en la población de caninos y equinos analizados.

En México, no hay vacuna disponible contra CIV como medida preventiva. Por otra parte, la vacunación contra EIV no es obligatoria, por lo tanto, el estado inmune contra el virus de la gripe equina es desconocido. Sin embargo, la incidencia de EIV en 23 estados de Estados Unidos durante 2015 respalda la posibilidad de un brote dentro de la población equina (Sack et al., 2019). Esta población de animales está expuesta a múltiples factores de riesgo, tales como lesiones laborales, el contacto con los desechos y la interacción con diferentes especies animales (Rimbaud et al., 2006).

Las secuencias de nucleótidos parciales del gen de la matriz mostraron un 96.24 - 100% de homología con secuencias de genes de la matriz de los subtipos H1N1, H1N2 y H3N2 de cerdos en América del Norte obtenidos de Genbank. Varios estudios han mostrado una incidencia del subtipo H1N1/2009 en perros (Dundon et al., 2010; Ozawa et al., 2013; Su et al., 2014; Moon et al., 2015), así como posibles reordenamientos entre H1N1 con H3N2 (Song et al., 2012; Na et al., 2015; Wang et al., 2017).

La comparación de secuencias deducidas de aminoácidos de secuencias de genes de matriz equina y canina de cepas ancestrales A/Equine/1963 (H3N8), A/Equine/2003 (H3N8) y A/Canine/2006 (H3N8) indica que la mayoría de los aminoácidos son altamente conservados, obteniendo 92.96 - 97.19% de secuencias consenso. Las divergencias en las posiciones V15I, L20P, D30G, N36H, T37K no representan un cambio significativo en la proteína porque son aminoácidos sinónimos de los presentes en las cepas ancestrales. Además, las mutaciones en las posiciones S17P, Q26E, K35M, S70G, E71G y L74R están presentes en el dominio C-terminal que se caracteriza por ser altamente tolerante a las mutaciones que no comprometen la funcionalidad de la proteína viral (Hom et al., 2019).

Curiosamente, el análisis filogenético de las secuencias revela la cercanía filogenética con secuencias del gen M presentes en cepas de brotes zoonóticos en gatos, perros, cerdos y humanos: (A/Cat/USA/047732/18, A/Cat/OR/29573/2009, A/Canine/Ggx/WZ1/2013,

A/Sw/4/ Mexico/2009, A/ Hu/Mx/007/2009) con los subtipos H1N1 y H3N2, lo cual pone en evidencia la capacidad zoonótica del virus (Wiwanitkit, 2014; Parrish et al., 2015).

El estudio del virus de la influenza A en perros y caballos en México se ha limitado a la detección de anticuerpos contra el virus. La alta seroprevalencia obtenida en el análisis de anticuerpos de perros callejeros y equinos evidencia la susceptibilidad al virus de la influenza A entre animales en condiciones precarias de salud animal.

Los estudios de perros de compañía en México han demostrado una baja seropositividad contra el subtipo H1N1/2009, H3N2 (0.9%) y H3N8 (4%) (Ramírez et al., 2013). Por otro lado, los estudios de caninos de refugios de animales sugieren que la exposición prolongada al virus por parte de otros perros infectados aumenta considerablemente la seropositividad de los animales analizados del 15% al 71% después de 8 días de confinamiento (Holt et al., 2010). Un factor limitante en este estudio es la falta de información sobre la permanencia de perros callejeros en refugios de animales.

La seropositividad de los caballos analizados en este estudio (92.68%) fue superior al 57.89% reportado en Nuevo León en 2010 (Blitvich et al., 2010). Sin embargo, este porcentaje es similar al informado por Gaíva e Silva et al., en caballos no vacunados de Brasil durante un brote en 2014, donde encontraron una seroprevalencia del 92%.

En la propagación de aislamientos en cultivo de células, se observó como las células a las 14 horas p.i. presentaban desprendimiento y lisis celular debido a la carga de agentes virales. No obstante, posterior al 9no pase de infección se observó efecto citopático característico de una infección por influenza A (Youil *et al.*, 2004). Si bien, ya teníamos un antecedente de la actividad neutralizante de anticuerpos dirigidos a la proteína de matriz, se procedió a determinar la capacidad neutralizante de anticuerpos vacunales y de campo inducidos por una infección natural. Los anticuerpos con mayor actividad neutralizante (150* - 320*), son aquellos producidos por una infección natural y que resultaron positivos para la detección del virus. Por su parte los anticuerpos dirigidos a la proteína de matriz presentaron actividad neutralizante en diluciones 80* - 160*. Mientras que los anticuerpos dirigidos a la vacuna presentaron un rango de neutralización a las diluciones 60* - 80*. Estos resultados hacen evidente que la población de equinos muestreados posee una inmunidad humoral protectora frente al virus, este

comportamiento ya se había evidenciado en caballos no inmunizados frente al virus (Gaíva *et al.*, 2014) donde se observaron altos índices de seropositividad. Estos resultados sugieren que existen mutaciones en M1 implicadas en el reconocimiento por anticuerpos dirigidos a esta proteína, de manera que difieren en su capacidad de neutralizar a dos proteínas que provienen de dos cepas genéticamente diferentes. No obstante, se ha observado que incluso una inmunidad cruzada conferida por anticuerpos no es suficiente para una neutralización efectiva si se desconoce los cambios antigénicos de las proteínas a neutralizar (Park *et al.*, 2004). Es por ello por lo que es necesario vigilar las constantes mutaciones genéticas que repercuten en su capacidad antigénica. El análisis de predicción de epítopes arrojó al menos 6 predicciones de epítopes previamente reportados en otras especies animales (Lecomte y Oxford, 1981; Wyke *et al.*, 1984; Hankins *et al.*, 1989) entre los cuales las secuencias reportadas en este estudio diferían en al menos 2 epítopes. Esto evidencia la necesidad de realizar estudios de caracterización genética de los antígenos más conservados del virus que sean capaces de inducir una respuesta inmune protectora y efectiva frente a una infección natural. Esto es una perspectiva atractiva para conocer los mecanismos de evasión del virus frente al sistema inmune y su potencial antigénico.

9. CONCLUSIONES

Nuestros resultados revelan la prevalencia del virus de la influenza A en la población de caballos y perros en el estado de Nuevo León, México. Debido a que CIV y EIV se han extendido horizontalmente entre la población de perros y caballos en los Estados Unidos, la detección del virus de la Influenza A en caninos y caballos en el estado de Nuevo León, México, no es inesperada. La detección del gen M y los anticuerpos contra la proteína de la matriz proporcionan una identificación efectiva del virus de la influenza A en perros y caballos debido a la estabilidad genética y antigénica del gen M. Esto se vuelve importante debido a la variabilidad constante del virus y su necesidad de vigilancia epidemiológica constante. La vacunación juega un papel esencial para detener la propagación del virus, por lo que sugerimos que los sistemas de vacunación se actualicen y se regulen para mejorar las condiciones de salud de las especies susceptibles al virus.

10. BIBLIOGRAFÍA

1. Ali A., Avalos R., Polmaskin E., Nayak D. 2000. Influenza Virus Assembly: Effect of Influenza Virus Glycoproteins on the membrane association of M1 Protein. *Journal of Virology*. 74(18):8709.
2. Artz A, Baudin F, Barge A, Timmins P, Buemeister P, Ruigrok RW. 2001. Combined results from solution studies on intact Influenza Virus M1 protein and from a new crystal form of its N-terminal domain show that M1 is an elongated monomer. *Elsevier*. 279:439-446.
3. Belser JA, Lash RR, Garg S, Tumpey TM, Maines TR. 2018. The eyes have it: influenza virus infection beyond the respiratory tract. *Lancet Infectology Disease*. 18:220-227. DOI: 10.1016/S1473-3099(18)30102-6.
4. Blitvich BJ, Ibarra LA, Cortes AJ, Root JJ, Franklin AB, Sullivan HJ, Fernandez I. 2010. Seroprevalence of equine influenza virus in northeast and southern Mexico. *Veterinary Record*. 166:565-567. DOI: 10.1136/vr.b4845.
5. Bryant NA, Rash AS, Russell CA, Ross J, Cooke A, Bowman S, MacRae S, Lewis NS, Paillot R, Zanoni R, Meier H, Griffiths LA, Daly JM, Tiwari A, Chambers TM, Newton JR. y Elton DM. 2009. Antigenic and genetic variations in European and North American equine influenza virus strains (H3N8) isolated from 2006 to 2007. *Vet Microbiol*. 138: 41-52.
6. Bucher D., Popple S., Baer M., Mikhail A., Gongo Y., Whitaker C., Paoletti E. y Judd A. 1989. M Protein (M1) of Influenza Virus: Antigenic Analysis and Intracellular Localization with Monoclonal Antibodies. *Journal of Virology*. 63(9):3622-3633.
7. Centers for Disease Control and Prevention (CDC): Key Facts about Canine Influenza (Dog Flu). Available at: <https://www.cdc.gov/flu/other/canine-flu/keyfacts.html>.
8. Crawford PC, Dubovi EJ, Castleman WL, Stephenson I, Gibbs EPJ, Chen L, Smith C, Hill RC, Ferro P, Pompey J, Bright RA, Medina MJ, Johnson CM, Olsen CW, Cox NJ, Klimov AI, Katz JM, Donis RO. 2005. Transmission of Equine Influenza virus to Dogs. *Science*. 310: 482. DOI: 10.1126/science.1117950.
9. Cullinane A, Elton D. y Mumford J. 2010. Equine influenza – surveillance and control. *Influenza Other Respir Viruses*. 4: 339-344.

10. Dundon WG, De Benedictis P, Viale E, Capua I. 2010. Serologic Evidence of Pandemic (H1N1) 2009 Infection in Dogs, Italy. *Emerging Infectious Diseases*. 16:2019-2021. DOI: 10.3201/eid1612.100514.
11. Gaíva L, Costa AM, Cassaro EM, Custodio M, Siquetin EM, Castro A, Assis I, Moura D. 2014. Prevalence of antibodies against Influenza virus in non-vaccinated equines from the Brazilian Pantanal. *Revista Do Instituto De Medicina Tropical De Sao Paulo*. 56:487-492. DOI: 10.1590/S0036-46652014000600006.
12. Guarnaccia T, Carolan LA, Maurer-Stroh S, Lee RTC, Job E, et al. (2013) Antigenic Drift of the Pandemic 2009 A(H1N1) Influenza Virus in a Ferret Model. *PLoS Pathog* 9(5): e1003354. doi:10.1371/journal.ppat.1003354.
13. Guiping W, Shifeng H., Xinglong Y. (2010). Development of latex agglutination test for detecting antibodies against avian influenza virus based on matrix 1 protein expressed in vitro. *Avian Diseases* Vol. 54, No. 1, 2010, Pages 41–45.
14. Hall TA. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium*. 41:95-98.
15. Hankins R.W, Nagata K, Bucher D, Popple S, Ishihama A. 1989. Monoclonal antibody analysis of Influenza virus matrix protein epitopes involved in transcription inhibition. *Viruses genes*. 3:111-126.
16. Harris A, Forouhar F, Qiu S, Sha B, Luo M. 2001. The crystal structure of the Influenza Matrix protein M1 at Neutral pH: M1-M1 protein interfaces can rotate in the oligomeric structures of M1. *Virology*. 289:34-44.
17. Hayward JJ, Dubovi EJ, Scarlett JM, Janeczko S, Holmes EC, Parrish CR. 2010. Microevolution of Canine Influenza Virus in Shelters and Its Molecular Epidemiology in the United States. *Journal of Virology*. 84:12636-12645. DOI: 10.1128/JVI.01350-10.
18. Holt DE, Moyer MR, Brown DC. 2010. Serologic prevalence of antibodies against canine influenza virus (H3N8) in dogs in a metropolitan animal shelter. *American Veterinary Medical Association*. 237: 71-73. DOI: 10.2460/javma.237.1.71.
19. Hom N, Gentles L, Bloom JD, Lee KK. 2019. Deep mutational scan of the highly conserved Influenza A Virus M1 matrix protein reveals substantial intrinsic mutational tolerance. *Journal of Virology*. 93:1-16. DOI: e00161-19.

20. Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI). 2014. Agricultura, ganadería y pesca. Available at: <https://www.inegi.org.mx/>
21. Kash J, Walters K, David AS, Sandouk A, Schwartzman LM, Jagger BW, Chertow DS, Qi L, Kuestner RE, Ozinsky A, Taubenberger JK. 2011. Lethal synergism of 2009 Pandemic H1N1 Influenza Virus and *Streptococcus pneumoniae* coinfection is associated with loss of murine lung repair responses. *mBio*. 2:e00172-11. DOI: 10.1128/mBio.00172-11.
22. Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K. 2018. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Molecular Biology and Evolution*. 35:1547–1549. DOI: 10.1093/molbev/msy096.
23. Landolt I, Scherrer AU, Zagordi O, Bianchi M, Wyrzucki A, Steck M, Lederger B, Gunthard HF y Hangartner L. 2014. Prevalence and predictor for homo – and heterosubtypic antibodies against influenza A virus. *Clin Inf Dis*. 59(10): 1386-93.
24. Lecomte J, Oxford J.S. 1981. Detection of antigenic variation of Influenza A matrix protein by a competitive radioimmunoassay. *J gen. virol*. 57:403-406. Doi: 0022-1317/81/0000-4660 \$02.00.
25. Lee C, Jung K, Oh J, Oh T, Han Sm Hwang J, Yeom M, Son D, Kim J, Park B, Moon H, Song D, Kang B. 2010. Protective efficacy and immunogenicity of an inactivated avian-origin H3N2 canine influenza vaccine in dogs challenged with the virulent virus. *Veterinary Microbiology*. 143:184-188. DOI: 10.1016/j.vetmic.2009.11.037.
26. Leenaars M, Hendriksen CFM. 2005. Critical steps in the production of polyclonal and monoclonal antibodies: Evaluation and recommendations. *Institute for Laboratory Animal Research Journal*. 46:269-279. DOI: 10.1093/ilar.46.3.269.
27. Lin HT, Wang CH, Chueh LL, Su BL, Wang LC. 2015. Influenza A(H6N1) Virus in dogs, Taiwan. *Emerging Infectious Diseases*. 21:2154-2157. DOI: 10.3201/eid2112.141229.
28. Löhr CV, DeBess EE, Baker RJ, Hiatt SL, Hoffman KA, Murdoch VJ, Fischer KA, Mulrooney DM, Selman RL, Hammill-Black WM. 2010. Pathology and viral antigen distribution of lethal pneumonia in domestic cats due to pandemic (H1N1)

- 2009 influenza A virus. *Veterinary Pathology*. 47:378-386. DOI: 10.1177/0300985810368393.
29. Mancipe LF, Ramírez G, Jaime JC, Vera V. 2011. Cultivos celulares como alternativa para el aislamiento y la producción de biológicos contra el virus de la Influenza. *Ciencias Biomédicas*. Bogotá, Colombia. 15(19):83-93.
30. Mathieu C, Moreno V, Retamal P, Gonzalez A, Rivera A, Fuller J, Jara C, Leocq C, Rojas M, García A, Vasquez M, Agredo M, Gutiérrez C, Escobar H, Fasce R, Mora J, García J, Fernández J, Ternicier C. y Avalos P. 2010. Pandemic (H1N1) 2009 in Breeding Turkeys, Vaparaíso, Chile. *Em Inf Dis*. 16(4):709-711.
31. Maya R. 2011. Estabilidad Estructural de la Proteína M1 del Virus Pandémico de la Influenza A H1N1/2009: Análisis in vitro e in silico. Instituto Politécnico Nacional
32. Medina RA y García AS. 2011. Influenza A viruses: new research developments. *Nature*. Macmillian Publishers Limited. 590-601.
33. Metzger DW, Sun K. 2013. Immune Dysfunction and bacterial coinfections following influenza. *Journal of Immunology*. 191:2047-2052. DOI: 10.4049/jimmunol.1301152.
34. Moon H, Hong M, Kim JK, Seon B, Na W, Park SJ, An DJ, Jeoung HY, Kim DJ, Kim JM, Kim SH, Wenny RJ, Webster RG, Kang BK, Song D. 2015. H3N2 canine influenza virus with the matrix gene from the pandemic A/H1N1 virus: infection dynamics in dog and ferrets. *Epidemiology and Infection*. 14:772-780. DOI: 10.1017/S0950268814001617.
35. Na W, Lyoo KS, Song E, Hong M, Yeom M, Moon H, Kang B, Kim J, Song D. 2015. Viral dominance of reassortants between canine influenza H3N2 and pandemic (2009) H1N1 viruses from a naturally co-infected dog. *Virology Journal*. 12:134. DOI: 10.1186/s12985-015-0343-z.
36. Nayak B., Kumar S., DiNapoli J.m Paldurai A., Perez D., Collins P., Samal S. 2004. Contributions of the Avian Influenza Virus HA, NA, and M2 Surface Proteins to the Induction of Neutralizing Antibodies and Protective Immunity. *Journal of Virology*.
37. Noda Takeshi. 2012. Native Morphology of Influenza Virions. *Front Microbiol*. 2:296

38. Noton S., Medcalf E., Fisher D., Mullin A., Elton D., Digard P. (2007). Identification of the domains of the influenza A virus M1 matrix protein required for NP binding, oligomerization and incorporation into virions. *Journal of General Virology*. 88, 2280-2290.
39. Ozawa M, Kawaoka Y. 2013. Crosstalk between animal and human influenza viruses. *Annual Review of Animal Biosciences*. 1:21-42. DOI: 10.1146/annurev-animal-031412-103733.
40. Park AW, Wood JL, Daly J, Newton J, Glass K, Henley W, Mumford J, Grenfell B. 2004. The effects of strain heterology on the epidemiology of equine influenza in a vaccinated population. *Proc. R. Soc. Lond. (1548)*: 1547-1555.
41. Parrish CR, Murcia PR, Holmes EC. 2015. Influenza virus reservoirs and intermediate hosts: Dogs, horses, and new possibilities for influenza virus exposures of humans. *Journal of Virology*. 89:2990-2994. DOI: 10.1128/JVI.03146-14.
42. Payungporn S, Crawford C, Kouo TS, Chen L, Pompey J, Castleman W, Dubovi E, Katz JM, Donis R. 2008. Influenza A virus (H3N8) in Dogs with respiratory disease, Florida. *Emerging Infectious Diseases*. 14:902-908. DOI: 10.3201/eid1406.071270.
43. Pecoraro H, Bennett S, Huyvaert KP, Spindel ME, Landolt GA. 2014. Epidemiology and ecology of H3N8 canine influenza viruses in US shelter dogs. *J Vet Intern Med*. 1-8.
44. Ramírez LA, Contreras M, De la Luz J, Manjarrez M, Rosete DP, Rivera JF, Saavedra M, Ramírez H. 2013. Evidence of transmisión and risk factors for influenza A virus in household dogs and their owners. *Influenza and Other Respiratory Viruses*. 7:1292-1296. DOI: 10.1111/irv.12162.
45. Rimbaud E, Caballero P, Morales X, Soto JL, Rivera G, Zepeda N, Gutierrez M, Solorzano ME. 2006. Hoof, mouth and skin health situation of working horses from Granada city, Granada, Nicaragua. *Revista Electronica Veterinaria*. 7:1-12. ISSN 1695-7504.
46. Rozek W, Polak M, Zmudzinki J. 2003. Evaluation of immunological status of horses against influenza virus based on the presence of antibodies against NS1 and M1 proteins. *Bul Vet Inst Pulawy*, 47:315-324.

47. Sack A, Cullinane A, Daramragchaa, Chuluunbaatar M, Gonchigoo B, Gray GC. 2019. Equine Influenza Virus-A Neglected, Reemergent Disease Threat. *Emerging Infectious Diseases*. 25:1185-1192. DOI: 10.3201/eid2506.161846.
48. Sandt C.E., Kreijtz J.H., Rimmelzwaan G.F. 2012. Evasion of Influenza A viruses from innate and adaptive immune responses. *Viruses*. 4:1438-1476. Doi: 10.3390/v4091438.
49. Sha B and Luo M. 1997. Structure of a bifunctional membrane-RNA binding protein, influenza virus matrix protein M1. *Nature*. 4:3.
50. Singh RK, Dhama K, Karthik K, Khandia R, Munjal A, Khurana SK, Chakraborty S, Malik YS, Virmani N, Singh R, Tripathi BN, Munir M, Kolk JV. 2018. A Comprehensive Review on Equine Influenza Virus: Etiology, Epidemiology, Pathobiology, Advances in Developing Diagnostics, Vaccines, and Control Strategies. *Frontiers in Microbiology*. 9:1941. DOI: 10.3389/fmicb.2018.01941.
51. Song D, Kang B, Lee C, Jung K, Ha G, Kang D, Park S, Park B, Oh J. 2008. Transmission of avian influenza virus (H3N2) to Dogs. *Emerging Infectious Diseases*. 14:741-746. DOI: 10.3201/eid1405.071471.
52. Song D, Moon HJ, An DJ, Jeoung HY, Kim H, Yeom MJ, Hong M, Nam J, Park S, Park B, Oh J, Song M, Webster RG, Kim J, Kang B. 2012. A novel reassortant canine H3N1 influenza virus between pandemic H1N1 and canine H3N2 influenza viruses in Korea. *Journal of General Virology*. 93:551-4. DOI: 10.1099/vir.0.037739-0.
53. Spickler, Anna Rovid. 2016. Canine Influenza. Retrieved from: <http://www.cfsph.iastate.edu/DiseaseInfo/factsheets.php>
54. Staneková Z. y Varečková E. 2010. Conserved epitopes of influenza A virus inducing protective immunity and their prospects for universal vaccine development. *Virol J*. 7(1):351.
55. Su S, Chen J, Jia K, Khan S, He S, Fu X, Hong M, Sun L, Qi W, Gray G, Li S. 2014. Evidence for subclinical influenza A(H1N1) pdm09 virus infection among Dogs in Guandong Providence, China. *Journal of Clinical Microbiology*. 52:1762-1765. DOI: 10.1128/JCM.03522-13.

56. Toh X, Soh ML, Ng MK, Yap SC, Harith N, Fernandez CJ, Huangfu T. 2019. Isolation and characterization of equine influenza virus (H3N8) from an equine influenza outbreak in Malaysia in 2015. *Transbound Emerging Disease*. 66:1884-1889. DOI: 10.1111/tbed.13218.
57. Tong S, Zhu X, Li Y, Shi M, Zhang J, Bourgeois M., et al. 2013. New word bats harbor diverse influenza A viruses. *PLoS pathogens*. 9(10): e1003657. doi:10.1371/journal.ppat.1003657.
58. Voorhees IEH, Glaser AL, Toohey-Kurth K, Newbury S, Dalziel BD, Dubovi EJ, Poulsen K, Leutenegger C, Willgert K, Brisbane L, Richardson J, Holmes EC, Parrish CR. 2017. Spread of Canine Influenza A (H3N2) Virus, United States. *Emerging Infectious Diseases*. 23: 1950-1957. DOI: 10.3201/eid2312.170246.
59. Wang C, Wang Q, Hu J, Sun H, Pu J, Liu J, Sun Y. 2017. A multiplex RT-PCR assay for detection and differentiation of avian-origin canine H3N2, equine-origin H3N8, human-origin H3N2, and H1N1/2009 canine influenza viruses. *PLoS ONE*. 12:e0170374. DOI: 10.1371/journal.pone.0170374.
60. Wise HM, Hutchinson E, Jagger B, Stuart A, Kang Z, Robb N, Schwartzman L, Kash J, Fodor E, Firth A, Gog J, Taubenber J, Digard P. 2012. Identification of a Novel splice variant form of the Influenza A virus M2 Ion channel with an antigenically distinct ectodomain. *Plos pathogens*. 8,11:1-14.
61. Wiwanitkit V. 2014. Cross species influenza: emerging zoonosis. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*. 4:S642-S643. DOI: 10.1016/S2222-1808(14)60696-4.
62. World Health Organization (WHO). 2009. WHO information for laboratory diagnosis of pandemic (H1N1) 2009 virus in humans. Available at: https://www.who.int/csr/resources/publications/swineflu/WHO_Diagnostic_RecommendationsH1N1_20090521.pdf.
63. Wyke K.L., Yewdell J.W., Reck L.J., Murphy B.R. 1984. Antigenic characterization of Influenza A virus matrix protein with monoclonal antibodies. *Journal of Virology*. 49:248-252.
64. Yamanaka T, Tsujimura K, Kondo T, Matsumura T, Ishida H, Kiso M, Hidari KIP, Suzuki T. 2010. Infectivity and pathogenicity of canine H3N8 influenza A virus in horses. *Influenza and Other Respiratory Viruses* (4):345-351.

65. Ye Z, Liu T, Offringa P, McInnis J y Levandowski R. 1999. Association of Influenza virus matrix proteina with ribonucleoproteins. *J. Virol.* 79(9):7467-7473.
66. Youil R, Su Q, Toner TJ, Szymkowiak C, Kwan WS, Rubin B, Petrukhin L, Kiseleva I, Shaw AR, DiStefano D. 2004. Comparative study of influenza virus replication in Vero and MDCK cell lines. *J of Virol Met.* (120):23-31.
67. Zhao H, Ekstrom M. y Garoff. 1998. The M1 and NP proteins influenza A virus form homo- but nos heterooligomeric complexes when coexpressed in BHK-21 cell. *J. Gen. Virol.* 79:2435-2446.
68. Zhirnov O, Konakova T, Garten W. y Klenk. 1999. Caspase-dependent N-Terminal cleavage of Influenza Virus nucleocapsid protein in Infected cells. *Virol J.* 73(12):10158-10163.

11. RESUMEN BIOGRÁFICO

Claudia Bernardette Plata Hipólito

Candidato para el Grado de

Doctor en Ciencias con Orientación en Inmunobiología

Tesis: MUTACIONES EN EPÍTOPES DE NEUTRALIZACIÓN DE LA PROTEÍNA M1 DEL VIRUS INFLUENZA A DE EQUINOS Y CANINOS DEL ESTADO DE NUEVO LEÓN

Campo de Estudio: Virología

Datos Personales: Nacida en el municipio de San Pedro Garza García del estado de Nuevo León, México en 1991. Hija del Sr. José Luis Plata Hernández y la Sra. Petra Hipólito Martínez. Hermana de César Emiliano y Ana Luisa Plata Hipólito.

Educación: Egresada de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grado obtenido Licenciada en Químico Bacteriólogo Parasitólogo en el 2013. Posteriormente, se obtuvo el grado de Maestría en Ciencias con Orientación en Inmunobiología en el 2015 con mención honorífica.

Experiencia Profesional: Investigadora de Tiempo Completo y Profesora de Asignatura de las materias de Virología y Diagnóstico Molecular desde el 2018 en la Unidad de Virología del Laboratorio de Inmunología y Virología de la Facultad de Ciencias Biológicas, UANL.