

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
SUBDIRECCIÓN DE POSGRADO



TÍTULO DE TESIS:

**EVALUACIÓN DE ANTICUERPOS ANTI-M1 SOBRE LA NEUTRALIZACIÓN
DEL VIRUS INFLUENZA A**

PRESENTA:

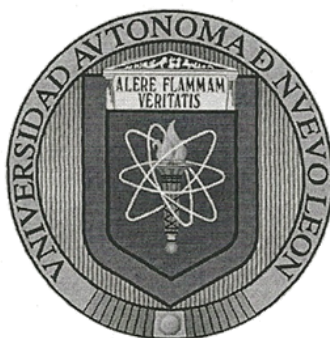
Q.B.P. CLAUDIA BERNARDETTE PLATA HIPÓLITO

**Como requisito parcial para obtener el GRADO de MAESTRA EN CIENCIAS
CON ORIENTACIÓN EN INMUNOBIOLOGÍA.**

San Nicolás de los Garza, N.L.

Junio, 2015.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
SUBDIRECCIÓN DE POSGRADO



**EVALUACIÓN DE ANTICUERPOS ANTI-M1 SOBRE LA NEUTRALIZACIÓN
DEL VIRUS INFLUENZA A**

COMITÉ DE TESIS:

Dr. Juan Francisco Contreras Cordero
(Director)

Dra. Lydia Guadalupe Rivera Morales
(Secretario)

Dr. José Ignacio González Rojas
(Vocal)

Dra. Licet Villarreal Treviño
(Vocal)

Dr. Carlos Eduardo Hernández Luna
(Vocal)

[Handwritten signature]

[Handwritten signature]

[Handwritten signature]

[Handwritten signature]

[Handwritten signature]

LUGAR DE TRABAJO

El presente trabajo de investigación se realizó en el 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

Quiero agradecer plenamente a todas las instituciones y personas que me apoyaron y permitieron desarrollar este proyecto para obtener el grado académico de Maestra en Ciencias con Orientación en Inmunobiología. Gracias a mi asesor el **Dr. Juan Francisco Contreras Cordero**, por brindarme la oportunidad de realizar mi trabajo de tesis bajo su dirección, por su paciencia y disciplina. Gracias a usted, me exijo cada día ser mejor estudiante, profesionista y persona.

Gracias a la **Dra. Cristina Rodríguez Padilla**, directora del Laboratorio de Inmunología y Virología de la Facultad de Ciencias Biológicas, UANL, por permitirme realizar mi tesis de Maestría en este laboratorio.

Agradezco plenamente a mi Comité de Tesis conformado por la **Dra. Lydia Guadalupe González Rivera**, **Dr. José Ignacio González Rojas**, **Dr. Carlos Eduardo Hernández Luna** y la **Dra. Licet Villarreal Treviño** por el enriquecimiento personal y profesional brindado durante el desarrollo de este trabajo.

A la **Dra. Sibilina Cedillo** y **MVZ. María Verónica González Vallejo** de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UANL, por proporcionarnos su apoyo con las muestras de caninos utilizadas en este estudio.

Gracias a mis compañeros del Laboratorio de Virología Unidad L-11, a **César Iván Romo Sáenz** y **Juan José Martínez Sanmiguel** muchas gracias por su apoyo y brindarme la ayuda necesaria para concluir este trabajo. A la **Dra. Griselda Edith Menchaca Rodríguez**, sigue siendo una inspiración profesional muy influyente en mi vida! Muchas gracias por toda su ayuda, sobre todo por contagiarme esa dedicación especialmente con cultivo celular. A **Lola, Yair, Marla** y **Karina**, gracias por el compañerismo y los buenos momentos en el laboratorio.

Quiero agradecer especialmente a **MVZ. Nelson Obregón**, por apoyarme con la colecta de las muestras de este estudio, muchísimas muchísimas gracias! Este trabajo no sería lo que es sin tu apoyo.

Muchas gracias a mis profesores de la maestría, por siempre dar lo mejor de sí y apoyarnos durante la realización de este trabajo, especialmente a la **Dra. Diana Caballero Hernández** por el interés y las sugerencias durante la elaboración de este trabajo.

A mis compañeros de la Maestría, a los que ahora llamo Amigos: **Yareellys, Mayra Sánchez, Talyha, Carlos, Felipe, Mariela, Ivon, Alex, David** y muchos más que han sido maravillosos conmigo y que hemos formado un gran equipo para realizar cualquier tarea. Mil gracias!

A mis amigos de toda la vida, **Mayra Meléndez, Zulema, Edgar, Martha, Alan, Megan** y más. Gracias por su apoyo y paciencia. Los quiero mucho!

Gracias a mi **Familia, mi mamá, mi hermana, mi hermano** y **mi sobrino** por compartir conmigo mis penas y mis alegrías, echarme porras cada que podían, es muy importante para mí que siempre estén ahí, a pesar de la distancia y el tiempo. Y repito, esto es para ustedes y por ustedes. Gracias a **mi papá**, por darme el coraje de no rendirme ni conformarme nunca. A **Jaime Abraham Cuello Villanueva**, porque constituyes el pilar de mi vida, gracias por tu paciencia y amor. A **DIOS** por darme vida y salud para concluir mi trabajo de investigación, permitirme estar con mi familia y permitirme estar en constante aprendizaje.

DEDICATORIA

*El presente trabajo es dedicado a mi mamá cuyo apoyo y amor me han
llevado a ser quien soy y luchar por mis sueños...
Eres increíble, brillante y única. Gracias! Te amo!*

*“Es bien sabido que para lograr ser magnífico,
Se requiere de esfuerzo, tiempo y amor”*

- Anónimo

TABLA DE CONTENIDOS

	Pág.
PORTADA (ANEXO 1)	i
COMITÉ DE TESIS (ANEXO 2)	ii
LUGAR DE TRABAJO	iii
AGRADECIMIENTOS	iv
DEDICATORIA	vi
TABLA DE CONTENIDOS	vii
LISTA DE TABLAS	ix
LISTA DE FIGURAS	x
NOMENCLATURA	xi
RESUMEN	xiii
ABSTRACT	xiv
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1 ETIOLOGÍA	3
2.2 EVOLUCIÓN DE LA INFLUENZA EQUINA	4
2.3 TRANSMISIÓN DE LA INFLUENZA EQUINA	6
2.4 CARACTERÍSTICAS DE LA PROTEÍNA DE MATRIZ M1	6
2.5 CARACTERÍSTICAS GENÉTICAS Y ANTIGÉNICAS	8
2.6 VARIABILIDAD GENÉTICA	9
2.7 ANTICUERPOS NEUTRALIZANTES ANTI-M1	10
3. JUSTIFICACIÓN	10
4. HIPÓTESIS	11
5. OBJETIVOS	12
5.1 OBJETIVO GENERAL	13
5.2 OBJETIVOS PARTICULARES	
6. METODOLOGÍA	
6.1 MUESTREO Y DETECCIÓN DE INFLUENZA A	14
6.1.1 EXTRACCIÓN DE RNA VIRAL	14
6.1.2 AMPLIFICACIÓN DEL GEN DE MATRIZ POR RT-PCR	15

6.1.3 PURIFICACIÓN DE PRODUCTOS DE PCR	16
6.1.4 ANÁLISIS DE SECUENCIAS	17
6.2 ANÁLISIS DE LA REACTIVIDAD DE ANTICUERPOS	17
6.2.1 EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA M1 PNDM RECOMBINANTE	18
6.2.2 PURIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA M1 PNDM RECOMBINANTE	19
6.2.3 DETECCIÓN DE ANTICUERPOS ANTI-M1 PNDM EN SUERO DE EQUINOS Y CANINOS POR EL SISTEMA DE ELISA TIPO HADAS.	20
6.3 ADAPTACIÓN DE LA CEPA DE CAMPO DE INFLUENZA EQUINA	20
6.3.1 INFECCIÓN DE LA LÍNEA CELULAR VERO CON LA CEPA VACUNAL A2/EQUINE/KENTUCKY/97	21
6.3.2 MICROTITULACIÓN DE UNIDADES FORMADORAS DE FOCOS	21
6.3.3 UNIDADES FORMADORAS DE PLACAS	22
6.3.4 NEUTRALIZACIÓN DE FOCOS INFECCIOSOS	23
7. RESULTADOS	24
7.1 TIPIFICACIÓN DE MUESTRAS POR RT-PCR ANIDADA	25
7.1.1 ANÁLISIS DE SECUENCIAS OBTENIDAS	26
7.2 DETECCIÓN DE ANTICUERPOS CONTRA EL VIRUS INFLUENZA A EN EQUINOS Y CANINOS	30
7.3 DETERMINACIÓN DE LA PRESENCIA DE ANTICUERPOS NEUTRALIZANTES DIRIGIDOS A LA PARTÍCULA VIRAL COMPLETA	35
7.3.1 CUANTIFICACIÓN DE PARTÍCULAS VIRALES	36
7.3.2 DETECCIÓN DE ANTICUERPOS NEUTRALIZANTES	37
8. DISCUSIÓN	39
9. CONCLUSIONES	42
10. BIBLIOGRAFÍA	43
11. RESUMEN BIBLIOGRÁFICO	48
12. EVIDENCIA FOTOGRÁFICA	49

LISTA DE TABLAS

Número	Tabla	Página
1	Condiciones de retrotranscripción para la síntesis de cDNA.	15
2	Condiciones de PCR para la síntesis de productos de pcr de 244 pb.	16
3	Muestras colectadas en los municipios de Nuevo León en el período Enero 2014 - Abril 2015.	24
4	Muestras positivas por RT- PCR aisladas de equinos	25
5	Muestras positivas por RT-PCR aisladas de caninos	26
6	Sueros seropositivos de equinos colectados en el 2011	33
7	Sueros seropositivos de equinos colectados en el 2014	33
8	Sueros seropositivos de caninos colectados en el 2015	34
9	Análisis de especificidad de anticuerpos neutralizantes contra una cepa vacunal y una cepa de campo de Influenza Equina.	37

LISTA DE FIGURAS

Número	Figura	Pág.
1	Características genéticas del virus Influenza A	4
2	Características antigénicas de la Hemaglutinina y Cladograma de distribución evolutiva de la influenza equina	5
3	Electroforesis del productos de PCR en gel de Agarosa 1.5%	25
4	Electroforesis en Agarosa Low Melting 1.5% y Electroforesis de productos de PCR	26
5	Comatograma de muestras secuenciadas	27
6	Análisis de Identidad de la muestra de campo Equino 4 programa BLAST del NCBI.	28
7	Análisis de Identidad de la muestra vacunal A2/Equine/Kentucky/97 programa BLAST del NCBI.	29
8	Alineamiento de secuencias con la herramienta bioinformática BioEdit v7.2.5.	30
9	Análisis de deducción de aminoácidos y sus respectivos porcentajes.	31
10	Producción de M1 pandémica recombinante	32
11	Análisis comparativo de anticuerpos entre equinos y caninos	34
12	Propagación de cepa vacunal A2/Equine/Kentucky/97 en la línea celular Vero	35
13	Propagación de cepa de campo Equino 4 en la línea celular Vero	35
14	Titulación de focos infecciosos con tinción de Inmunoperoxidasa	36
15	Tinción de ensayo en placa	36
16	Ensayo de neutralización viral	37

NOMENCLATURA

aa	Aminoácidos
DNA	Ácido desoxirribonucleico
cDNA	Cadena complementaria de DNA
RNA	Ácido ribonucleico
IA	Influenza A
DH5 α	Nombre de cepa de E.coli 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	Mililitros
μ l	Microlitros
MEM	Medio esencial minimo
ng	Nanogramos
nm	Nanómetros
pb	Pares de bases de nucleótidos
PBS	Buffer salino de fosfatos
PBS A	Bufere salino de fosfatos sin calcio ni magnesio

pi	Posterior a la infección
BL21 (DE3)	Nombre de cepa de E.coli utilizada para producir proteínas recombinantes
D-MEM	Medio de Eagle modificado de Dulbecco's
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
HRP	Peroxidasa de rábano

RESUMEN

La influenza es una enfermedad reemergente altamente contagiosa responsable de panzootias, epizootias y pandemias en la población humana y animal. El agente causal de esta enfermedad es el virus Influenza A. Recientemente, se han reportado brotes de influenza equina alrededor del mundo, principalmente en Asia y Norteamérica, donde esta enfermedad es endémica. Su importancia radica en su rápida diseminación en caballos no vacunados e inadecuados procedimientos de cuarentena en los animales infectados. Debido a la variabilidad genética y antigénica que presentan las proteínas de superficie de este virus, se ha buscado determinar el rol de las proteínas más estables en la inducción de inmunidad protectora así como el grado de variabilidad genética de estas proteínas. En este estudio se realizó la detección del virus en ocho muestras de fluido nasal de equinos y 68 caninos de las cuales 63 fueron fluido nasal y 5 de biopsias de pulmón. Los resultados muestran la amplificación de un fragmento de 244 pb en 6 (75%) de las muestras equinas y 20 (29.4%) de las caninas. Análisis de secuencia de un fragmento de 244 pb de una muestra de campo indica relación filogenética con secuencias del gen 7 de influenza virus A del genbank de cerdos de linaje americano, asiático y europeo. Asimismo, se detectó la presencia de anticuerpos anti-influenza en el suero de ambas especies animales con una seroprevalencia del 81.3% en suero de caballos obtenidos en el 2011, un 92.68% en el 2014 y un 100% de seropositividad en suero de caninos muestreados en el 2015. Ensayos de neutralización viral con anti-M1 pandémica, muestran diferencias en la inhibición de focos infecciosos entre un aislado de campo y la cepa vacunal Kentucky/97. Asimismo, uno de los sueros de campo positivos por el ensayo de ELISA presenta mayor capacidad neutralizante contra la cepa de campo que con la vacuna. Estos resultados sugieren que existen mutaciones que alteran el reconocimiento de la proteína M1 de los aislados de campo y vacunal por los anticuerpos producidos contra la proteína recombinante M1 pandémica.

ABSTRACT

Influenza is a highly contagious reemerging disease responsible of panzootics, epidemics and pandemics in human and animal populations. The causal agent of this disease is the Influenza A virus have recently been reported outbreaks of equine influenza around the world, mainly in Asia and North America, where the disease is endemic. Its importance lies in its rapid spread in unvaccinated horses and inadequate quarantine procedures in infected animals. Due to the genetic and antigenic variability of the surface proteins of this virus, we have sought to determine the role of the most stable in the induction of protective immunity and the degree of genetic variability of these proteins. In this study the detection of virus was performed on eight samples of nasal fluid horses and dogs 68 of which were 63 and 5 nasal fluid lung biopsies. The results show amplification of a 244 bp fragment in 6 (75%) of equine samples and 20 (29.4%) of canine. Sequence analysis of a 244 bp fragment of a wild type sample indicates phylogenetic relationship with gene sequences 7 influenza A virus of swine genbank American, Asian and European lineage. Also, the presence of anti-influenza antibodies was detected in the serum of both animal species with a seroprevalence of 81.3% in sera obtained from horses in 2011, a 92.68% in 2014 and 100% seropositivity canine serum sampled by 2015. Viral neutralization assays with anti-M1 pandemic protein, show differences in inhibiting infectious foci between a wild type isolate and the vaccine strain Kentucky / 97. Also, one of the wild type sera positive by the ELISA assay exhibits greater neutralizing capacity against the wild type strain with the vaccine. These results suggest that there are mutations that alter recognition of the M1 protein isolates from wild type and vaccine by antibodies produced against the recombinant protein M1 pandemic.

1. INTRODUCCIÓN

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 desechos (SAGARPA, 2012). En Nuevo León, cientos de caballos son sobreexplotados al ser sometidos a jornadas de trabajo sin descanso. Anemia, desnutrición, infecciones y enfermedades respiratorias son las principales causas de muerte de estos animales. Brigadas organizadas por asociaciones no gubernamentales, brindan atención médica a caballos 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, seguido de *Parainfluenza* (Mancini *et al.*, 2014) y enfermedades bacterianas secundarias (Kohler, 2014). El virus de la influenza equina pertenece a la familia *Orthomyxoviridae* género *Influenzavirus A* y posee un genoma de RNA segmentado de polaridad negativa. La clasificación del virus en subtipos se lleva a cabo por los antígenos de superficie: Hemaglutinina y Neuraminidasa. De acuerdo a esta clasificación se han identificado dos subtipos que infectan caballos: A/equine/2 (H3N8) y A/equine/1 (H7N7) (Bryant *et al.*, 2009). Este último subtipo no ha sido detectado desde 1980, sin embargo el subtipo H3N8 ha sido reportado en brotes epizooticos respiratorios alrededor del mundo (Burnell *et al.*, 2014).

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 son responsables del potencial de evasión del sistema inmune y la transmisión constante del virus 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).

Recientemente se han utilizado alternativas de detección que basan su efectividad en las proteínas más estables del virus, cómo son la nucleocápside 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). La cepa pandémica A (H1N1) 2009 contiene una combinación única de segmentos provenientes de diferentes linajes, el séptimo gen que codifica para la proteína de matriz M1 proviene del linaje Euroasiático de cerdos, originalmente derivado de una cepa aviar (Garten *et al.*, 2009). Las distancias evolutivas entre los segmentos génicos de este virus encontrado en diferentes hospederos, indican el potencial que tienen estos virus a pasar por procesos de recombinación genética. Este estudio está dirigido a determinar la presencia del genoma viral en fluido nasal de caballos y perros, así como la detección de anticuerpos anti M1 en el suero de ambas especies animales y el efecto de estos anticuerpos y de un antisuero policlonal producido contra la proteína M1 pandémica recombinante sobre la neutralización de cepas de campo adaptadas a un cultivo celular.

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. Es por ello que 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) (**Figura 1**). 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.

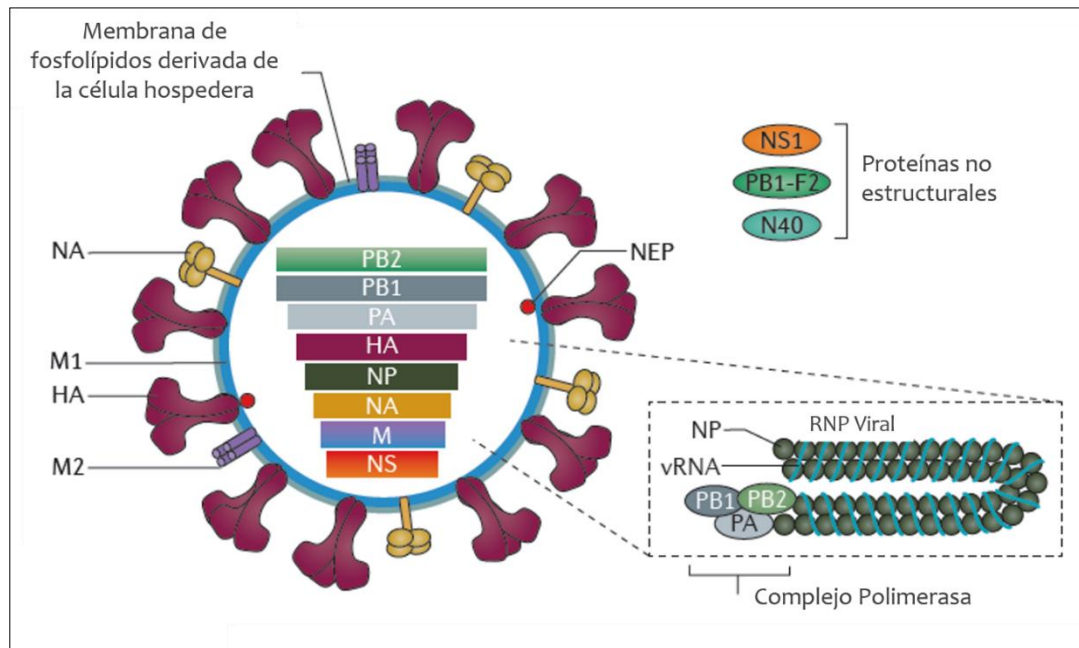


Figura 1 El genoma del virus Influenza A es de RNA de polaridad negativa, codifica para 11 a 14 proteínas. Estas son la proteína de exportación nuclear (NEP; también conocida como NS2) y la proteína no estructural antagonista de la respuesta antiviral de la célula huésped NS1, las cuales son codificadas por el segmento NS. Las proteínas de matriz M1 y la de canal iónico M2, codificadas por el segmento M. La Hemaglutinina (HA) que funge como receptora de reconocimiento con la célula huésped, la Neuraminidasa (NA) que destruye los enlaces de ácido siálico, la Nucleoproteína (NP) y el complejo Polimerasa dependiente de RNA (PB1, PB2 y PA) (Medina y García, 2011).

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 aviares 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 (**Figura 2a**) (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) (**Figura 2b**). Esto, en contraste con la divergencia del sublinaje Florida cuyas cepas predominantes constituyen de manera atenuada la vacuna contra influenza equina (OIE, 2015).

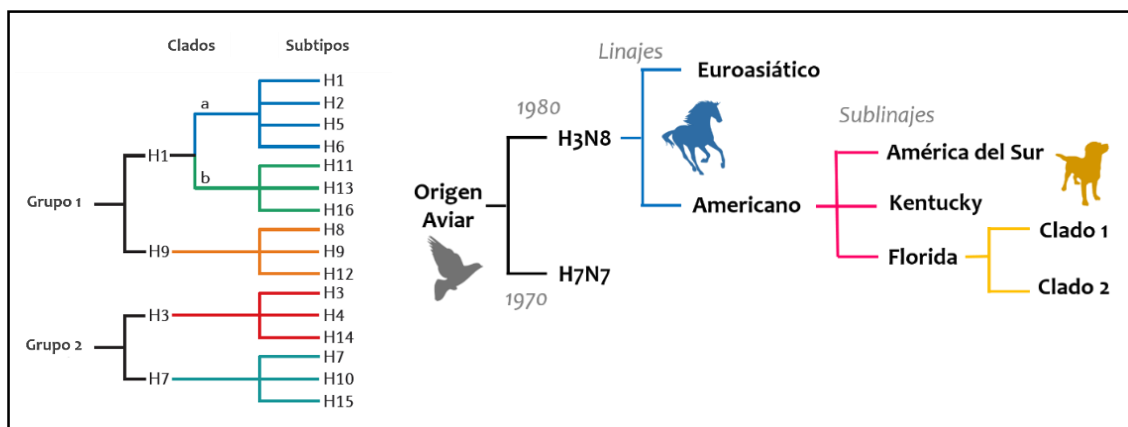


Figura 2 **a)** Las características antigénicas de la HA la clasifican en dos grupos, que a su vez se dividen en 4 subgrupos, clasificando las 18 HA reportadas hasta la fecha. **b)** Cladograma que muestra la distribución evolutiva de la Influenza Equina y la divergencia de los sublinajes.

La evolución antigénica del virus se produce a través del *Drift Antigénico* el cual se caracteriza por la selección de nuevas cepas que contienen cambios en la secuencia de aminoácidos de HA y NA. Estos cambios evaden parcialmente la inmunidad en humanos y animales por lo que estas cepas consecuentemente serían los responsables de las próximas pandemias. Cambios más drásticos en las secuencias aminoacídicas de las proteínas son debidas al *Shift Antigénico* el cual está asociado a la emergencia de nuevas cepas por la recombinación de segmentos génicos en coinfecciones de dos o más cepas en una única célula huésped. Es por ello que es vital conocer las variaciones que tienen un rol importante en el ciclo replicativo del virus así como las presentes en su genotipo ya que son un factor determinante en la susceptibilidad del huésped, su patogenicidad y la evasión al sistema inmune (Medina y García 2011).

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 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 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).
- 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).
- Interactúa con caspasas antiapoptóticas (Zhimov *et al*; 1999).

La proteína M1 de matriz es codificada por el segmento 7 del genoma que es conformado por 1027 nt, este gen tras sufrir un 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 (Dubois *et al*; 2014). 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.

2.5 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 aluminación 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 antiapoptóticas, 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 D. *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).

2.6 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).

2.7 Anticuerpos Neutralizantes 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

El presente estudio se enfoca en determinar la capacidad neutralizante de anticuerpos producidos por una infección natural y Anti-M1 pandémica. La constante variabilidad de las proteínas de superficie HA y NA a través de mutaciones puntuales, rearrreglos génicos y procesos de recombinación de sus segmentos génicos muestran la necesidad de evaluar el rol que tienen las proteínas más estables del virus como blanco para la neutralización viral. Siendo la influenza una enfermedad emergente con potencial de diseminación mundial a través de diferentes especies animales, el ampliar el conocimiento de la proteína M1 como blanco inmunológico aumentará las expectativas de control de este virus.

4. HIPÓTESIS

Existe diferencia en la neutralización del virus influenza A por anticuerpos producidos contra el virus influenza o la proteína M1 recombinante.

5. OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GENERAL:

Determinar la capacidad neutralizante de anticuerpos anti- influenza A y anti-M1recombinante sobre un aislado de campo y una cepa vacunal.

5.2 OBJETIVOS PARTICULARES:

- 5.2.1 Determinar la presencia del virus Influenza A en muestras de caninos y equinos del estado de Nuevo León.
- 5.2.2 Analizar la presencia de anticuerpos anti-influenza obtenidos del suero de caballos y perros del Estado de Nuevo León
- 5.2.3 Determinar la capacidad neutralizante de anticuerpos anti-M1 pandémica y de anticuerpos producidos por una infección natural sobre una cepa vacunal y un aislamiento de campo propagados en cultivo celular.

6. METODOLOGÍA

6.1 MUESTREO Y DETECCIÓN DE INFLUENZA A:

En el presente estudio se manipularon muestras de suero, fluido nasal y RNA obtenido de biopsias de pulmón de perros y caballos del estado de Nuevo León en el período Enero 2014 – Abril 2015. Las muestras de fluido nasal de caballos fueron colectados con hisopos estériles en medio de mantenimiento MEM + Antibiótico/Antimicótico (10,000 unidades/ml Penicilina G sódica, 10,000 µg/ml Estreptomicina sulfato, 25 µg/ml Anfotericina B Fungizone en solución salina 0.85%) 2% Gibco® y almacenadas a -20°C hasta su uso. Las muestras de sangre fueron obtenidas por punción en la yugular (en el caso de equinos) y por punción venosa (en perros), posteriormente se centrifugaron a 3,000 rpm durante 15 minutos para obtener el suero. Las muestras de RNA aisladas de tejido de pulmón y fluido nasal de perros fueron proporcionadas por la Facultad de Veterinaria de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

Tanto perros como caballos muestreados en este trabajo pertenecían al estado de Nuevo León y su área metropolitana y se obtuvo la información posible con las fichas de colecta que solicitaban lo siguiente: Fecha de colecta, Lugar de Colecta, Vacunación, Sexo, Síntomas (Presencia de fluido nasal, Tos, Fiebre y Anorexia), Tipo de muestra obtenida y Observaciones adicionales.

6.1.1 EXTRACCIÓN DE RNA VIRAL

Para las muestras de fluido nasal se realizó una extracción de RNA utilizando TRI REAGENT (Trizol) para la detección del virus Influenza A. A partir del fluido nasal se tomó una alícuota de 300 µl y posteriormente se centrifugó a 12,000 rpm durante 5 minutos. Posteriormente se adicionó 500 µl de Trizol, para liberar el RNA. Se agitó 10 veces en vortex, durante un instante con intervalos entre cada agitación y después los tubos se incubaron en hielo 5 minutos. Posteriormente, se adicionó 100 µl de cloroformo, y se agitó en vortex 10 veces un instante con intervalos entre cada agitación. Los tubos se incubaron en hielo 3 minutos y después se centrifugaron a 12,000 rpm por 15 min/4°C. La fase acuosa se transfirió a un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml limpio previamente etiquetado, y luego se adicionó 400 µl de alcohol

isopropílico. Se mezcló por inversión 5 veces y los tubos se mantuvieron a -20°C toda la noche. Posteriormente, los tubos se centrifugaron a 12,000 rpm por 15 min/ 4°C , se retiró el alcohol isopropílico con un micropipeta de 200 μl dejando aproximadamente 50 μl en el tubo. Se adicionó 1 ml de alcohol etílico absoluto (frío), se mezcló por inversión 5 veces y se centrifugó a 12,000 rpm por 7 min/ 4°C . Se retiró el alcohol etílico y para eliminar las sales, se adicionó 1 ml de alcohol etílico al 75% (frío), se mezcló por inversión 5 veces y se centrifugó a 12,000 rpm por 5 min/ 4°C . Se retiró el alcohol etílico y para evaporar los restos de alcohol, los tubos se dejaron abiertos en una campana de flujo laminar por 20 minutos. Posteriormente el RNA viral fue resuspendido con 20 μl de agua nanopura estéril y se almacenó a -20°C hasta su uso.

6.1.2 AMPLIFICACIÓN DEL GEN DE MATRIZ POR RT-PCR

Una vez obtenido el RNA viral, se sometió a una transcripción inversa con la enzima transcriptasa reversa del virus de la leucemia murina de Moloney (MMLV Reverse Transcriptase ®, BIOLINE). Para la retrotranscripción se realizó la siguiente mezcla de reactivos en un tubo de microcentrífuga de 0.2 ml conteniendo:

Reactivo	Volumen por reacción	Concentración Final
RNA	9 μl de RNA	\sim 300-400 ng/ μl de RNA
Forware M1 25 μM	4.5 μl	3.75 μM
Buffer RT 5X 10 μM	6 μl	2 μM
dNTPs 25mM (Bioline)	9.6 μl	8 mM
Enzima RT(10,000 u Promega)	0.9 μl	300 unidades
		Volumen final: 30 μl

Tabla 1. Condiciones de retrotranscripción: Termociclador TERMOHYBAID PCRspring. Programa: 70°C por 10 min / 42°C por 1 h / 94°C por 3 min.

Una vez obtenido el cDNA, utilizamos los oligonucleótidos recomendados por la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2014) para la tipificación del virus Influenza A utilizando la siguiente mezcla de reactivos:

Reactivo	Volumen por reacción	Concentración Final
cDNA	1.5 µl de DNA	~200 ng/µl de DNA
Buffer NH ₄ 10 (Bioline)	2.5 µl	1 X
Buffer MgCl ₂ 25 µM	0.76 µl	0.76 µM
Forware 25 µM OMS	0.5 µl	0.5 µM
Reverse 25 µM OMS	0.5 µl	0.5 µM
dNTPs 25 mM (Bioline)	4 µl	4 mM
Taq polimerasa (Bioline)	0.25 µl	Volumen final: 25 µl

Tabla 2. Condiciones de la reacción de polimerasa: Termociclador TERMOHYBAID PCRspring. Programa: 94°C por 3 min / (94°C por 30 s / 60°C por 30 s / 72°C por 3 min) por 30 ciclos / 72 °C por 10 min / 4°C por 1 h. Al final se añadió un tiempo de extensión de 5 min, para permitir que se adicione al extremo 3'-OH.

Para el análisis de resultados se realizó una electroforesis en un gel de agarosa al 1.5%, a 100 volts constantes por 50 minutos. Posteriormente se tiñó con bromuro de etidio durante 15 min y revelado con luz ultravioleta en el transluminador (UVP, Transilluminator). Como control para la retrotranscripción como para PCR se utilizaron las siguientes vacunas como control positivo y negativo, respectivamente: Fluvac Innovator Pfizer Vacuna Influenza Equina (Virus Inactivado Tipo A2, cepa Kentucky 97) // Vacuna Vanguard Plus 5 L4 (Virus activo modificado y virus inactivado. Cada dosis contiene un mínimo de $10^{3.5}$ TCID₅₀ de virus del Distemper Canino, $10^{3.4}$ TCID₅₀ del Adenovirus canino tipo 2, $10^{5.5}$ TCID₅₀ del virus de la ParaInfluenza Canina, CPV $10^{7.2}$ TCID₅₀ de Parvocirus Canino, 600 Unidades Nefelométricas (UN) de *L. Canicola*, 600 UN de *L. icterohaemorrhagiae*, 600 UN de *L. grippotyphosa* y 600 UN de *L. Pomona*).

6.1.3 PURIFICACIÓN DE PRODUCTOS DE PCR

Los productos de PCR se sometieron a una electroforesis en gel de agarosa Low Mealing 1.5% a 100 Volts constantes por 1 h, seguida de una tinción con bromuro de etidio por 15 min. Utilizando una lámpara de luz ultravioleta (UVP, Transilluminator) con baja intensidad se cortó el fragmento con la banda de interés, estos fragmentos se depositaron en un tubo de centrifuga y se purificaron utilizando el Kit WizardRSV Gel and PCR Clean-Up System (Promega), para su posterior secuenciación.

Realizamos una cuantificación de los productos de PCR utilizando nanodrop, dado a que a las recomendaciones solicitadas por el Instituto de Biotecnología de la UNAM,

en Cuernavaca, Morelos. Enviamos 16µl de muestra que contenían 120 ng de DNA, mezclados con 10 pmoles de oligonucleótido que amplifica la región codificante de M1.

6.1.5 ANÁLISIS DE SECUENCIAS

La secuencia de nucleótidos de las cepas de campo, fueron analizadas utilizando la herramienta BLAST nucleotide (NCBI) para comprobar que el gen pertenece al virus Influenza A obteniendo un 70% - 80% de identidad. En seguida, se realizó una comparación de la secuencia de nucleótidos y la secuencia deducida de aminoácidos utilizando el programa CLUSTAL W / Bio Edit Sequence Alignment Editor v7.0. Se realizó alineamientos entre las muestras de campo con las obtenidas de la base de datos del Nucleotide Sequence Database (GenBank) con el software Molecular Evolutionary Genetics Analysis 5.05 (MEGA) y determinar la proximidad evolutiva entre ellas. Todas las secuencias de nucleótidos/aminoácidos obtenidas de las cepas del virus Influenza A, serán depositadas en el Nucleotide Sequence Database (GenBank).

6.2 ANÁLISIS DE LA REACTIVIDAD DE ANTICUERPOS

Previamente en el laboratorio se amplificó, clonó y secuenció el segmento de 766 pb que codifica para la proteína de matriz M1 pandémica del 2009 por lo que procedimos a partir de los plásmidos pGEM-T que contenían la secuencia. Estos fueron digeridos utilizando las enzimas de restricción BamH I y Sal I, para esto los plásmidos fueron purificados por lo que de cada plásmido pGEM-T y pET-28a (+) con inserto se realizaron 2 reacciones de restricción. La mezcla de reactivos se realizó en tubos de microcentrifuga de 0.6 mL utilizando el mismo protocolo previamente descrito para el análisis de plásmidos purificado. La mezcla de reactivos se incubó a 37°C por 1.5 h y posteriormente se realizó una electroforesis de todo el volumen de reacción de restricción en gel de agarosa 1.5 % LOW MEALTING a 100 V constantes por 1 h. El gel se tiñó con bromuro de etidio por 15 min y utilizando una lámpara UV (UVP, Translluminator) con intensidad baja se procedió a cortar el fragmento de gel con el fragmento liberado del plásmido pGEM-T. Los fragmentos del gel se depositaron en un tubo de microcentrifuga y se purificaron con el Kit Wizard SV Gel and PCR Clean-

Up System (Promega). El plásmido pET-28a (+) digerido, se sometió a una electroforesis en gel de agarosa 1.5 % LOW MEALTING para realizar una purificación a partir de gel. Los insertos y plásmidos purificados son almacenados a 4°C hasta su uso. Para la ligación del producto de PCR se mezcló en un tubo de centrifuga de 0.2 mL, 1.0 µL de Solución amortiguadora T4 DNA Ligasa 5X (Invitrogen), 3.0 µL de inserto-PCR, 1.0 µL de plásmido pET-28a (+) linealizado (50 ng/ µL), 1.0 µL de enzima T4 DNA Ligasa 10U/ µL (Invitrogen) y 4.0 µL de agua nanopura estéril para completar un volumen final de 10.0 µL. La reacción de ligación se incubó a 4°C toda la noche. Se transformaron utilizando el protocolo previamente descrito utilizando los 10 µL de reacción de ligación. Las bacterias transformadas se inocularon en una caja de Agar LB/Kanamicina (50 µg/mL) y se incubaron a 37°C por 12 h. Se purificaron los plásmidos de las clonas de bacterias de *E. coli* DH5α transformadas utilizando el Kit Wizard Plus SV Minipeps DNA System (Promega) y mediante una reacción de restricción y/o PCR se analizó la presencia de inserto-PCR. Se transformaron bacterias *E. coli* BL21 calciocompetentes utilizando el protocolo previamente descrito utilizando los 10 µL de reacción de ligación. Las bacterias transformadas se inocularon en una caja de Agar LB/Kanamicina (50 µg/mL) y se incubaron a 37°C por 12 h. Se purificaron los plásmidos de las clonas de bacterias de *E. coli* DH5α transformadas utilizando el Kit Wizard Plus SV Minipeps DNA System (Promega) y mediante una reacción de restricción y/o PCR se analizó la presencia de inserto-PCR.

6.2.1 EXPRESIÓN DE PROTEÍNA M1 PANDÉMICA RECOMINANTE

Para la inducción de proteínas recombinantes se tomaron tres asadas del cultivo de bacterias BL21 (DE3) transformadas y se inocularon en tubos de ensaye 13X100 con 3 ml de caldo LB/Kanamicina (50 µg/ml), y se incubaron a 37°C con agitación de 200 rpm durante la noche. Posteriormente, se inocularon 120 ml de caldo LB (sin antibiótico) con 1.2 ml de cultivo de bacterias durante toda la noche, realizando una dilución 1:100, las bacterias se mantuvieron en agitación a 250 rpm a 37°C por 2 h. Al terminar este tiempo se revisó la densidad óptica del cultivo y se tomó una alícuota de 1 ml para medir la absorbancia de 590 nm. El matraz continuó en agitación constante hasta que la densidad óptica alcanzó entre 0.4-0.6 de absorbancia. Cuando el cultivo presentó la densidad requerida, se suspendió la incubación un instante para tomar una alícuota de 10 ml de cultivo, el cual se tomará como control de bacterias

no inducidas, esta alícuota permanecerá almacenada a 4°C. Al resto del cultivo se le adicionó IPTG a una concentración final de 1 mM para inducir la expresión de la proteína M1 recombinante. Se continuó con la incubación a 37°C con agitación de 250 rpm por 5 h. Las bacterias inducidas y las no inducidas se transfirieron a tubos cónicos de 50 ml y se centrifugaron a 5,000 rpm a 4°C por 10 min. El caldo LB se decantó y el pellet de bacterias se pesó para resuspender las bacterias en el buffer B1. Por cada gramo de pellet de bacterias, se adicionaron 10 ml de buffer. Las bacterias resuspendidas se almacenaron a 20°C hasta su uso.

6.2.2 PURIFICACIÓN DE PROTEÍNA M1 RECOMBINANTE

La proteína M1 recombinante en las bacterias BL21 (DE3) son producidas en el citoplasma, por lo cual, se realizó un análisis de las bacterias en dos etapas. Primero se utilizó una lisozima de clara de huevo (Sigma-Aldrich) a una concentración final de 0.2 mg/ml, agitándose por 30 min a temperatura ambiente. El extracto de las bacterias se dispensó en alícuotas de 1 ml en tubos de centrifuga de 1.5 ml. Para realizar una lisis mecánica se utilizó un sonicador durante 15 min. Para disolver los posibles cuerpos de inclusión que se forman por un alta producción de proteínas recombinantes que impiden que se solubilice la proteína se adicionó al extracto de bacterias urea a una concentración final de 8 M. Se realizó mediante una cromatografía de afinidad utilizando las columnas de purificación HisTrap FF Crude (GE Healthcare), debido a que las proteínas recombinantes presentan 6 Histidinas en tándem en el extremo amino. La cromatografía se realizó bajo condiciones desnaturalizantes por lo que los reactivos utilizados contienen urea a una concentración final de 4M. Para realizar la cromatografía, primero se lavó una columna nueva con 20 ml de agua bidestilada para eliminar el etanol 20% (solución de almacenaje); después se adicionaron 10 ml de solución amortiguadora B2 para equilibrar la columna. Posteriormente se pasó todo el volumen de extracto de bacterias lisadas previamente ajustado a un pH de 7.4. Se colocó todo el eluente para posteriores purificaciones. En seguida se realizó un lavado con 20 ml de solución amortiguadora B3 para eliminar la unión inespecífica de proteínas bacterianas y después se adicionaron 5 ml de solución amortiguadora de elución colectándose 5 fracciones cromatográficas de 1 ml cada una en tubos de microcentrifuga de 1.5 ml. Por último se aplicaron 10 ml de solución amortiguadora B2 para lavar y equilibrar la columna. Las

fracciones cromatografías y las columnas de afinidad son almacenadas a 4°C hasta su uso. Posteriormente se realizó un SDS-PAGE para determinar la sobre expresión de la proteína recombinante M1 del virus influenza.

6.2.3 DETECCIÓN DE ANTICUERPOS ANTI-M1 PANDÉMICA EN SUEROS DE EQUINOS Y CANINOS POR UN SISTEMA DE ELISA TIPO HADAS

En placas de 96 pozos se sensibilizaron con 75 µl del suero problema (Caninos y equinos) diluidos en una relación 1:10 en solución amortiguadora de carbonato-bicarbonato pH 9.6 los cuales se incubaron a 4°C toda la noche. Posteriormente se realizaron dos lavados con solución amortiguadora PBS-Tween 20 0.1%. Bloqueamos con una solución de leche descremada 5% en PBS-Tween 0.1% a 37°C por una hora para evadir uniones inespecíficas. Después de dos lavados más se adicionó la proteína M1 recombinante a una concentración de 40 µg/µl diluida en una solución de bloqueo las cuales se incubarán por una hora. Posterior a 2 lavados se adicionó un anticuerpo policlonal de conejo de 30 días anti-M1 a una concentración 1:7000 diluido en buffer de bloqueo, el cual se incubó durante una hora a 37°C. Después de dos lavados se añadió 75 µL de Proteína A-Peroxidasa de rábano (Amersham) diluida 1:2,500 y se incubó a 37°C por 40 min. Se retiró la proteína A-HRP, se lavó 2 veces y se homogenizó con 50 µl de sustrato ABTS (Zymed). Finalmente se incubó a 37°C por 20 min, para detener la reacción colorimétrica se añadieron 50 µL de SDS al 1%. La reacción colorimétrica fue medida en un lector de ELISA (Digital and Analog Systems S.R.L modelo A2) a una absorbancia de 450 nm.

6.3 ADAPTACIÓN DE CEPA DE CAMPO DE INFLUENZA EQUINA.

Se realizó una alícuota del fluido nasal en un tubo cónico de 1.5 ml (La muestra se realiza con un hisopo estéril y se deposita en un medio de transporte adicionado con anti-anti). Se Homogenizó con cuidado y se centrifugó a 12,000 rpm por dos minutos. Al obtener el sobrenadante y se adicionó 2 µl antibiótico-antimicótico (También puede utilizarse ampicilina a una concentración final de 50 µg/ml). Posteriormente se filtró el sobrenadante con antibiótico con un filtro de 0.45 micras (Esterilizar filtro con papel y utilizar una jeringa estéril). Se tomó 1 ml de sobrenadante filtrado y se adicionó 1 µl de Tripsina 1% para activar el virus. Incubamos a 37°C por 30 minutos. Retiramos el medio de cultivo del vial confluyente a infectar y realizar dos lavados de

la monocapa con PBS A 1X. Añadimos el virus. Agitamos el frasco suavemente durante 30 minutos a temperatura ambiente. E Incubamos una hora a 37°C con una atmosfera del 5% de CO₂ por 3-4 días.

6.3.1 INFECCIÓN DE LA LÍNEA CELULAR VERO CON LA CEPA VACUNAL A2/Equine/Kentucky/97

Se activaron 300 µl de vacuna (*Virus atenuado Pfizer Fluvac Innovator*) con 1 µl de Tripsina 1% mezclando suavemente con la micropipeta. Se incubó durante 30 minutos a 37°C (Utilizando incubadora de CO₂). Retiramos el medio de cultivo del vial confluyente a infectar y realizar dos lavados de la monocapa con PBS A 1X o medio de cultivo SIN SUERO. Incubamos 1 hora a 37°C al 5% de CO₂. Luego agregamos 2 ml de Medio de cultivo SIN SUERO e incubar a 37°C hasta observar efecto citopático (De 3 a 5 días en esta línea celular). Para cosechar el virus, congelamos el tubo 30 min a -20°C, posteriormente descongelamos en agua templada a 37°C por 15 min. Repetimos esta operación 2 veces más y almacenamos el lisado a -70°C.

6.3.2 MICROTITULACIÓN DE UNIDADES FORMADORAS DE FOCOS (UFF/ml)

La cuantificación de partículas virales infecciosas (UFF/ml) en los lisados celulares, se realizó utilizando el protocolo de tinción con Inmunoperoxidasa descrito por Arias y colaboradores (Arias et al., 1987). Una alícuota de 350 µl de lisado celular con la cepa de campo Kentucky/97, fue activada con 1 µl de tripsina 1% (10µg/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 MA-104, con 200 µl de PBS A 1X y después se adicionó 50 µl de cada dilución del virus. También se incluyó 2 pozos con 50 µl del virus concentrado (sin diluir). Las células fueron incubadas a 37°C por una hora. Se retiró los virus y se lavó una vez con 200 µl de PBS A 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

A 5X, incubando 40 minutos a temperatura ambiente (condiciones sin esterilidad). Posteriormente se lavó 2 veces con 200 µl de PBS A 1X y se adicionó 75 µl de anti-M1 pándemica producido en conejo 30 días dfluido 1:100 en PBS A 1X. La placa se incubó a 370C por una hora. Se retiró el anticuerpo y se lavó 2 veces con 200 µl de PBS A 1X, para adicionar 75 µl de Proteína A unida a Peroxidasa de rábano (Amersham) diluida 1:500. Se incubó a 370C por una hora. Se lavó 2 veces con 200 µl de PBS A 1X y se adicionó 75 µl de Carbazol (Sigma-Aldrich). La placa se incubó a 370C 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 la dilución donde se contó 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 contó de 100-200 focos infecciosos

6.3.3 UNIDADES FORMADORAS DE PLACAS

Sembramos en una placa de 6 pozos 1×10^6 células por pocillo. Una vez llegadas a confluencia (De 2 a 3 días después del pase), realizamos dos lavados a las células con PBS A 1X. Después realizamos diluciones seriadas del virus 10^2 to 10^{-7} en medio DMEM con 20 µg/ml de tripsina. Infectamos con 500 µl de cada dilución en sus respectivos pocillos. Incubamos a 37°C por 2 horas. Después retiramos los remanentes de la solución viral. Inmediatamente añadimos sobre la monocapa ya infectada con 4 ml de Agarosa 1X (Agarosa al 1%, diluída en DMEM-Glutamina 1%-SFB 3% y Tripsina 20 µg/ml). Permitimos solidificar durante 20-30 minutos. Incubamos las placas a 37°C a 5% de CO₂ por 48-72 horas. Una vez que las placas fueron claramente visibles, removimos cuidadosamente la capa de agarosa. Finalmente realizamos 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*.

6.3.4 NEUTRALIZACIÓN DE FOCOS INFECCIOSOS

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 1 µl de tripsina al 1%, incubándose a 37°C por 30 min. Posteriormente se realizó por duplicado diluciones del suero: 1:25, 1:50, 1:100, 1:200, 1:400 y 1:800 en una placa de 96 pozos estéril utilizando MEM sin suero. A 50 µl de cada dilución, se mezcló con 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 A 1X, y después se les adicionó 50 µl de la mezcla virus-anticuerpo. También se utilizó 2 hileras de 8 pozos como control negativo, en donde sólo se adicionó 50 µl de virus activado y diluido (100-200 UFF/ml). La placa se incubó a 37°C por 1 hora. Se retiró la mezcla virus-suero, y se hizo un lavado con 200 µl de PBS A 1X, después se adicionó 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.

7. RESULTADOS

En este estudio se evaluó el reconocimiento de anticuerpos anti-M1 sobre la neutralización del virus Influenza A en una cepa vacunal y un aislamiento de campo y propagados en la línea celular Vero. Para alcanzar este objetivo se realizó un muestreo de 8 municipios del estado de Nuevo León durante el período Enero 2014 – Abril 2015 y se colaboró con la Facultad de Veterinaria de la Universidad Autónoma de Nuevo León para la obtención de las muestras caninas. Colectamos 8 Fluidos nasales y 123 muestras de suero equino, mientras que de caninos 68 muestras de RNA y 123 muestras de suero. Para completar el diagnóstico de los animales se elaboró un formato para evaluar los síntomas presentes, además se recopiló información adicional sobre el cuidado animal con los dueños de los mismos (**ANEXO 1**).

Municipio	Equinos		Caninos	
Montemorelos	1 suero	1 Fn	S/M	S/M
Cadereyta	5 sueros	5 Fn	S/M	S/M
Zuazua	7 sueros	S/M	S/M	S/M
San Bernabé	81 sueros	1 Fn	S/M	S/M
Escobedo	2 sueros	1 Fn	S/M	S/M
San Nicolás	27 sueros	S/M	41 sueros	68 M/RNA
Guadalupe-Juárez	S/M	S/M	82 sueros	S/M
Total	123 sueros	8 Fn	123 sueros	68 RNA

Tabla 3. Muestras colectadas en los municipios del estado de Nuevo León en el período Enero 2014 – Abril 2015. S/M se refiere a Sin Muestras, Fn a Fluido Nasal y M/RNA a Muestras de RNA.

Las muestras caninas provenían de la Facultad de Veterinaria, donde se muestrearon caninos en el área metropolitana de Monterrey, N.L. Estos presentaban un Cuadro Respiratorio Agudo, asociado a otros virus respiratorios tales como *Parainfluenza* y *Distemper*. De las muestras de RNA caninas, 63 fueron obtenidas a partir de fluido nasal y 5 provenían de biopsia de pulmón. Las muestras de fluido nasal de equinos fueron obtenidos de caballos con síntomas evidentes de Influenza Equina, entre los que destacaban fiebre, secreción nasal purulenta, tos y falta de apetito. Los animales muestreados no habían sido previamente vacunados contra el virus Influenza, esto según los propietarios.

7.1 TIPIFICACIÓN DE MUESTRAS POR RT-PCR ANIDADA

Para la obtención de RNA total de Influenza, se realizó una extracción de RNA utilizando Trizol (TRI REAGENT). El RNA fue sometido a una retrotranscripción utilizando un oligo previamente diseñado en el laboratorio dirigido a la proteína de matriz M1. Una vez obtenido el cDNA se utilizaron los oligos recomendados por la Organización Mundial de la Salud (OMS) para la tipificación del virus Influenza A, obteniéndose un producto de PCR de 244 pb (Figura 3).

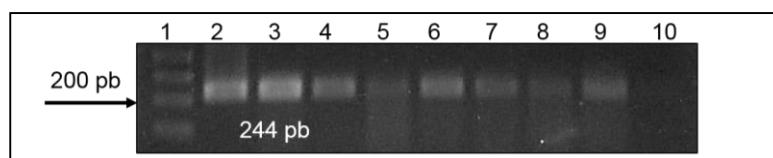


Figura 3. Electroforesis de productos de PCR en gel de Agarosa 1.5%. Carril 1: Marcador de pares de bases (pb) HyperLadder IV (Bioline); Carril 2 Control positivo de la vacuna Influenza Equina (Fluvac Innovator® Pfizer). Carriles 3-9 muestras positivas para Influenza A (Caninas y Equinas). Carril 10 Control negativo Vacuna Vanguard Plus 5 L4®.

Tipificación muestras equinas			
Fecha colecta	Localidad	Total	Positivos
31/03/14	Montemorelos	1	1
31/03/14	Cadereyta	5	3
23/09/14	San Bernabé	1	1
28/11/14	San Nicolás	1	1
		Total: 8	6 (75%)

Tabla 4. Tipificación muestras equinas para Influenza tipo A por PCR. Colectadas durante el período Marzo 2014 – Noviembre 2014.

De las 8 muestras de RNA colectadas de fluido nasal de caballos, obtuvimos que 6 (75%) son positivas para Influenza A. En cuanto a las muestras colectadas de caninos, de las 63 muestras obtenidas de fluido nasal obtuvimos que 15 (23.8%) resultaron positivas, en contraste de las 5 muestras de RNA aisladas de biopsia de pulmón las cuales todas resultaron positivas (Tabla 5). Dentro de nuestros controles de RT-PCR se utilizó una vacuna de Influenza Equina atenuada con la cepa Kentucky/97, esta muestra junto con una muestra de campo Equino 4, fueron amplificadas y purificadas para su posterior secuenciación.

Tipificación muestras caninas			
Cuadro			
Respiratorio Agudo	Tipo de muestra	Total	Positivos
	Fluido Nasal	63	15 (23.8%)
	Biopsia de pulmón	5	5 (100%)
		Total: 68	20 (29.41%)

Tabla 5. Tipificación de muestras caninas a Influenza tipo A por PCR. Muestras proporcionadas por la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnista, UANL.

La purificación de los productos de PCR se realizó con el Kit WizardRSV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) (**Figura 4a**). Y se observaron los fragmentos purificados en un gel de Agarosa al 1.5%. (**Figura 4b**).

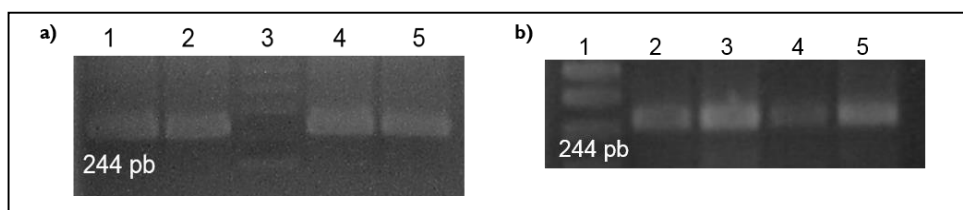


Figura 4. a) Electroforesis en Agarosa Low Melting 1.5%. b) Electroforesis de productos de PCR purificados.

Una vez realizada la purificación, se utilizaron las condiciones propuestas por el Instituto de Biotecnología de la UNAM, en Cuernavaca, Morelos; donde se realizó la secuenciación de la muestra Equino 4 y vacuna Kentucky/97. Esto para corroborar por secuencia la tipificación de nuestras muestras.

7.1.1 ANÁLISIS DE SECUENCIAS OBTENIDAS

Una vez obtenidos los cromatogramas de las secuencias (Figura 5), realizamos una edición de las mismas en el programa BioEdit Sequence Alignment Editor v7.2.5. Utilizando la herramienta bioinformática BLAST nucleotide de NCBI (Highly similar sequences) realizamos un análisis de identidad del fragmento de 244 pb. De la muestra Equino 4 obtuvimos una identidad del 86-88% con el gen 7 de la proteína M1 del subtipo H1N1 del virus Influenza A detectado en cerdo y perteneciente al linaje americano (Figura 6).

Mientras que la muestra vacunal equina Kentucky/97 obtuvo un 88% de identidad con con el gen 7 de la proteína M1 del subtipo H1N1 y H3N2 del virus Influenza A detectado en cerdo y perteneciente al linaje europeo, asiático y americano (Figura 7).

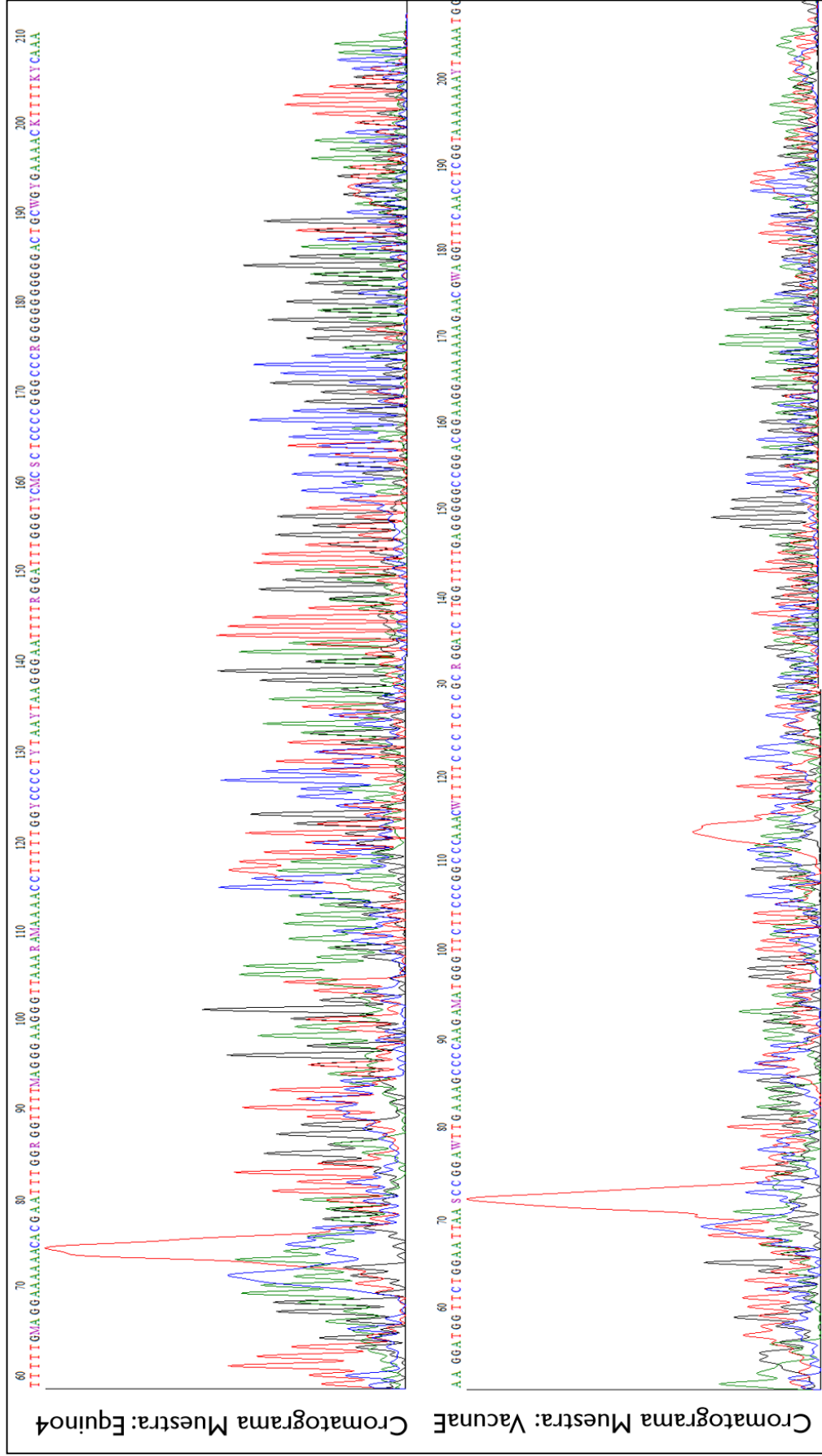


Figura 5. Cromatogramas de secuencias editadas en el programa BioEdit v7.2.5 . En la figura superior observamos la secuencia de nucleótidos de la muestra Equino 4. Mientras que en la imagen de abajo vemos la secuencia de nucleótidos de la muestra vacunal.

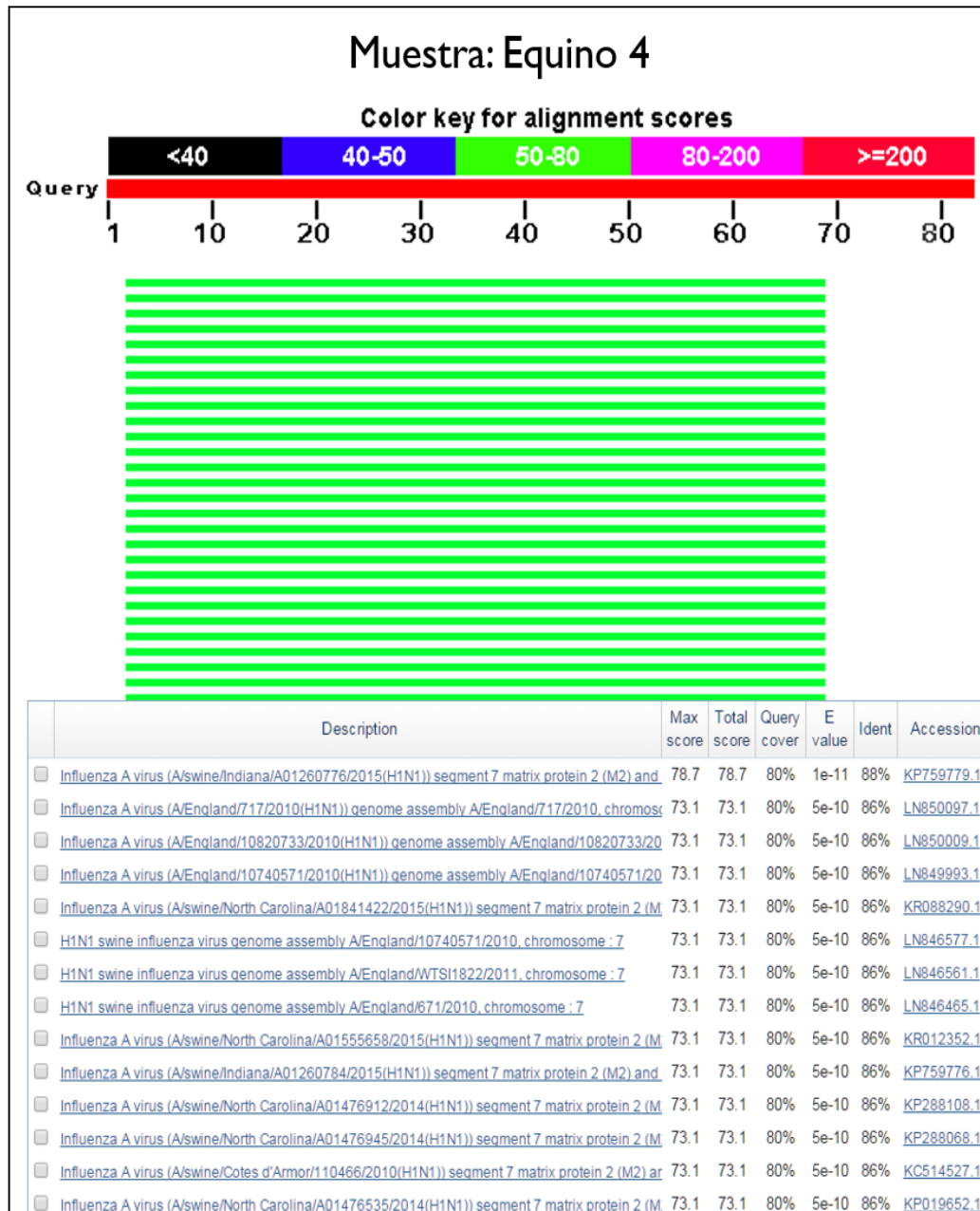


Figura 5. Análisis de identidad de la secuencia obtenida de la muestra de campo Equino 4 utilizando el programa BLAST nucleotide (NCBI).

Una vez corroborada la identidad de las secuencias, se realizó un alineamiento de las mismas para realizar un análisis comparativo entre la secuencia pandémica de nuestra proteína M1, utilizada para los ensayos de detección de anticuerpos y neutralización viral, obteniendo regiones con diferencias genéticas significativas (Figura 8), por lo que se buscó realizar una deducción de aminoácidos y determinar la diferencia en porcentajes (Figura 9).

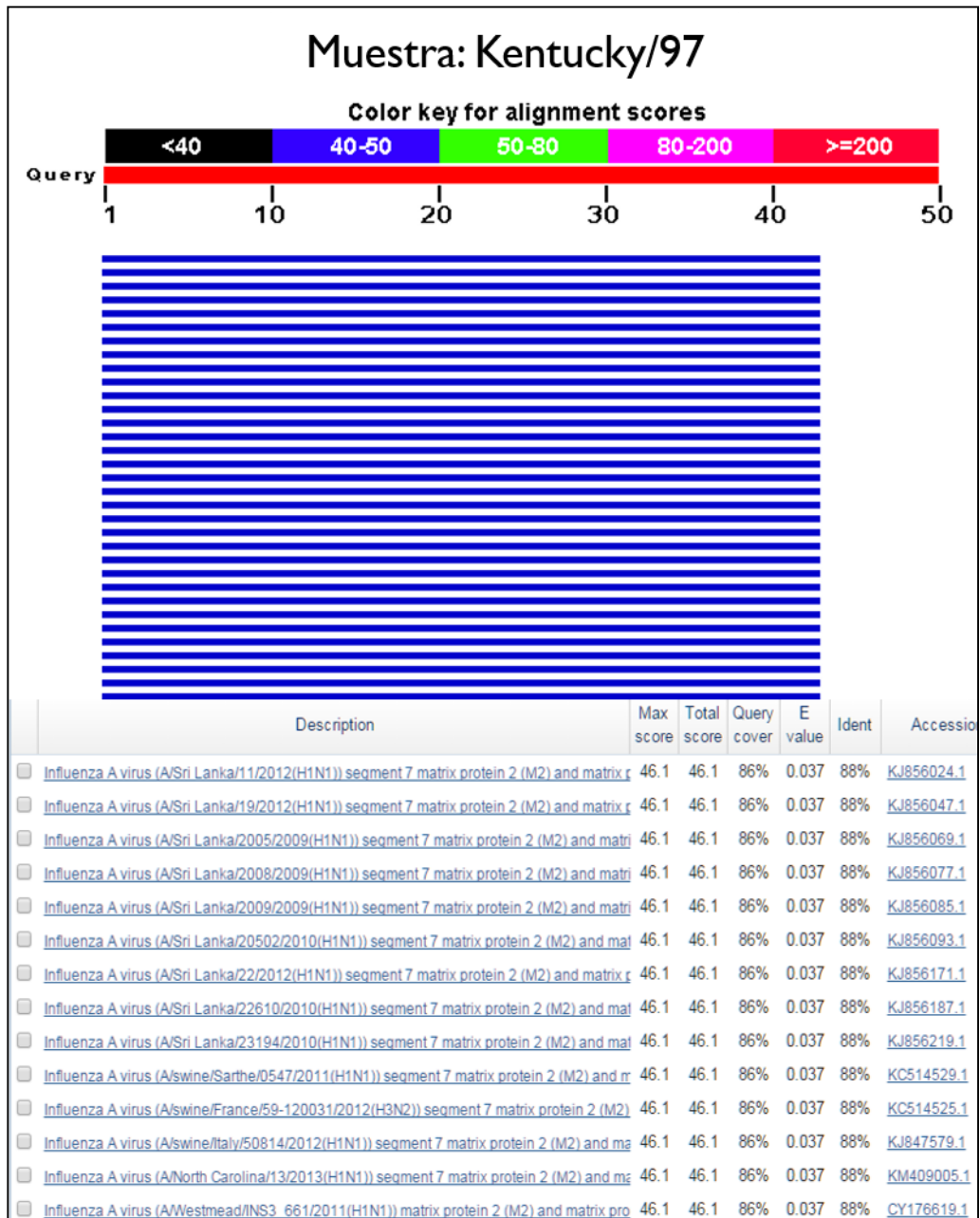


Figura 6. Análisis de identidad de la secuencia obtenida de la muestra vacunal equina Kentucky/97 utilizando el programa BLAST nucleotide (NCBI).

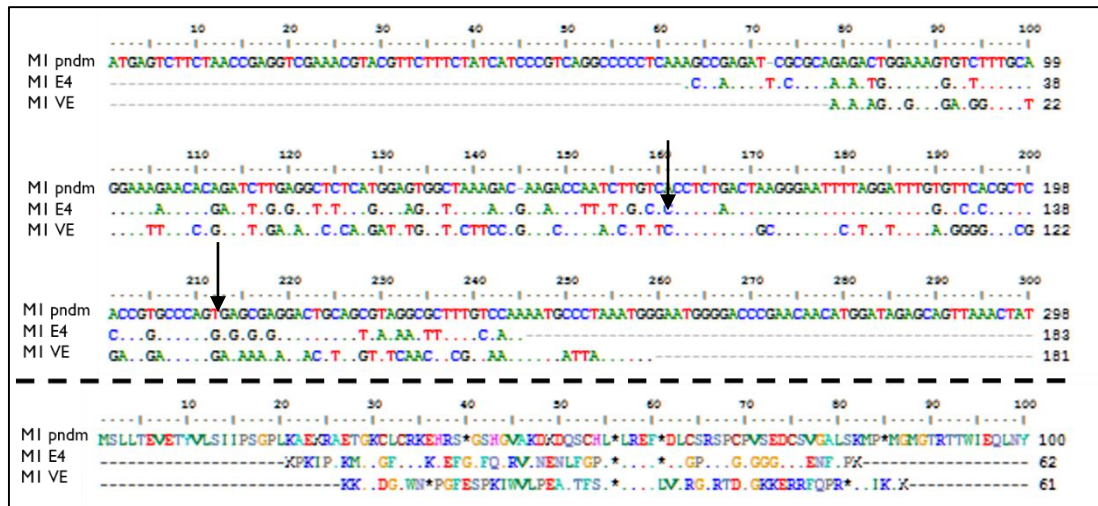


Figura 8. Alineamiento de las secuencias M1 (244pb) Equino 4 y Vacuna Equina respecto a la secuencia de M1 pandémica.

Se determinó el porcentaje de aminoácidos en las secuencias y observamos una diferencia de cargas entre las proteínas. La proteína pandémica posee una diversidad de cargas conferidas por los aminoácidos que la componen, no obstante prevalece una carga no polar en la proteína. Mientras que la proteína de la vacuna Kentucky/97 posee una presencia superior de lisinas y argininas lo que le confiere una carga positiva. Finalmente la proteína de Equino 4 de campo prevalecen aminoácidos no polares tales como Glicina y Leucina, los cuales interactúan con Prolinas también presentes en esta secuencia (Figura 9). En las tres secuencias analizadas podemos observar que de manera basal se presentan aminoácidos de carga negativa tales como el Aspartato y el Glutamato, mientras que aminoácidos con grupos aromáticos en la cadena “R” como Fenilalanina sólo se presentaron en la muestra Equino 4 .

7.2 DETECCIÓN DE ANTICUERPOS CONTRA EL VIRUS INFLUENZA A EN EQUINOS Y CANINOS

Para la detección de anticuerpos anti-Influenza A, se obtuvo de manera recombinante la proteína M1 pandémica del 2009. De manera que ligamos la secuencia que amplifica para esta proteína al vector de expresión pET-28(a), posteriormente transformamos bacterias E.coli BL21, bajo la inducción por IPTG obtuvimos la proteína que fue purificada por cromatografía en columna. Se caracterizó con un Western blot utilizando un anticuerpo anti-M1 pandémica (Figura 10).

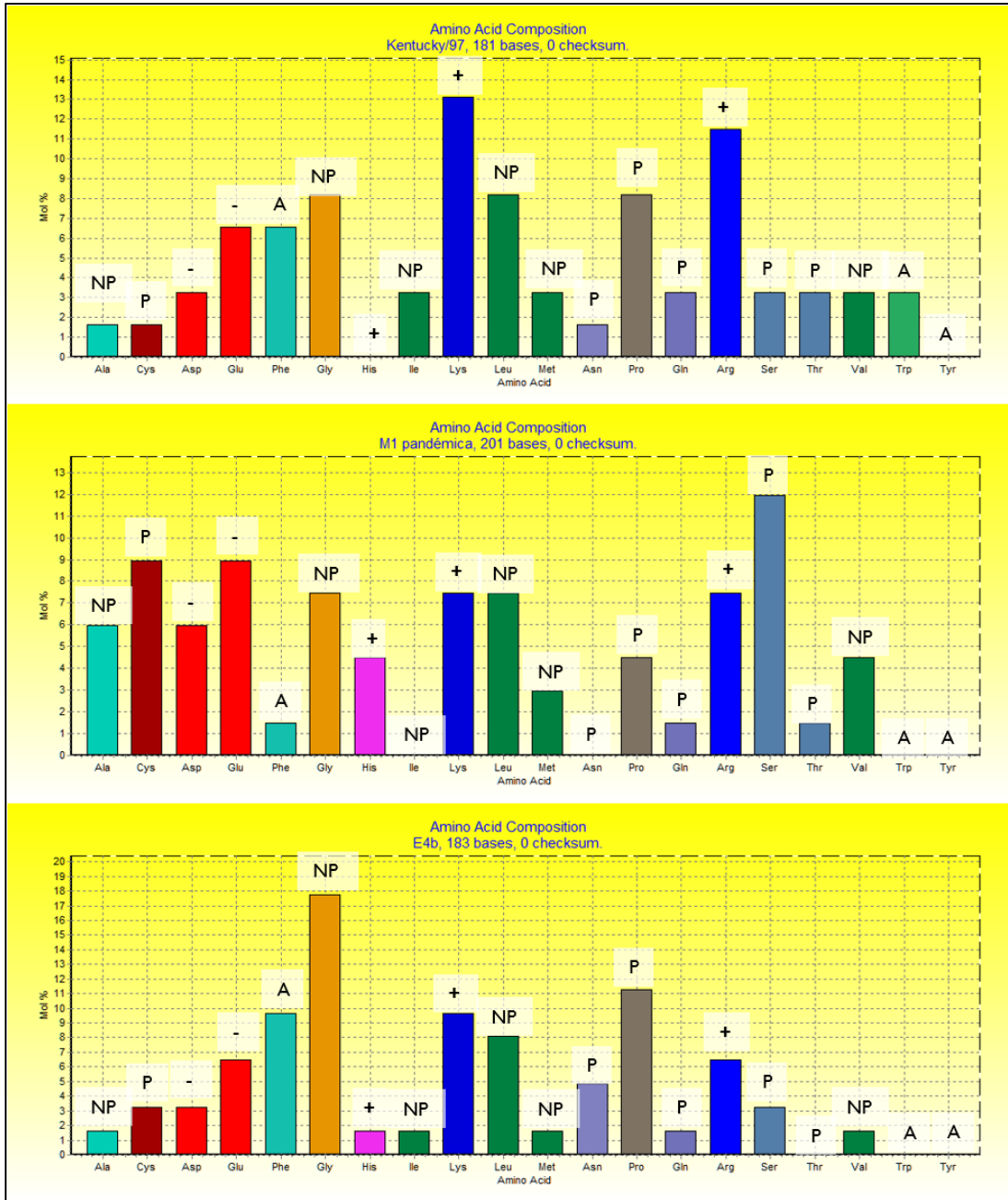


Figura 9. Análisis de deducción de aminoácidos y proporcionalidad de los mismos en las proteínas analizadas por BioEdit v7.2.5. NP : No polar, P: Polar, - : Negativo, +: Positivo, A: grupo "R" con cadena aromática.

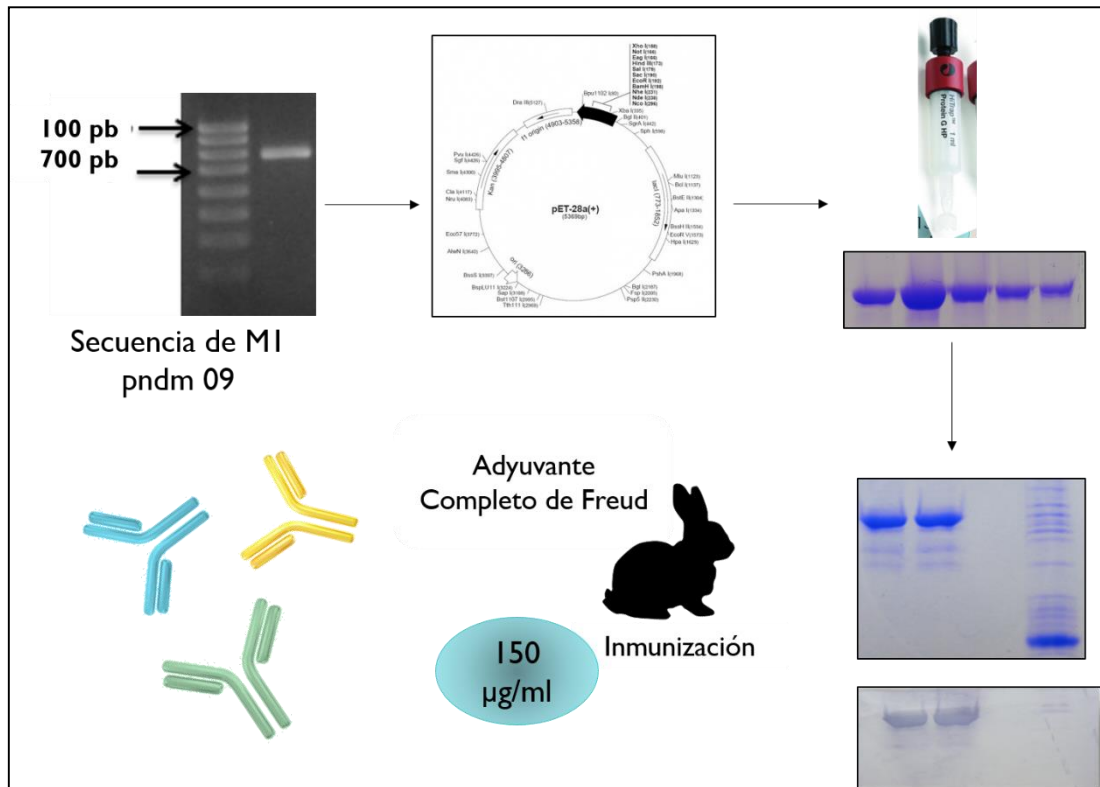


Figura 10. Producción de M1 pandémica recombinante. Se realizó una amplificación de la secuencia codificante para su posterior subclonación en el plásmido de expresión pET-28^a. Se transformaron bacterias *E.coli* BL21 con los plásmidos transformados, una vez obtenidas las proteínas se realizó una purificación con las columnas de purificación HisTrap. Realizamos una caracterización de su antigenicidad por un Western blot.

Durante el muestreo se obtuvieron 123 sueros de equinos de 8 municipios del estado de Nuevo León, el municipio que presentó más sueros fue el de San Bernabé dado que estos fueron colectados durante una Brigada de vacunación contra el Tétanos en caballos carretoneros en dicho municipio. Adicionalmente se nos proporcionó 150 sueros de caballo colectados en el mismo municipio del año 2011, estas muestras fueron almacenadas a -70°C hasta su uso. Estas muestras no cuentan con la información adicional de salud de cada animal, debido al escaso control del muestreo; sin embargo, estos animales no habían sido previamente vacunados contra el virus de Influenza Equina por parte de la Brigada en años anteriores. Los sueros colectados en los demás municipios fueron de caballos dedicados a diversas actividades, destacándose su renta para recolectar desechos y de crianza.

Los sueros colectados en San Nicolás pertenecían a caballos dedicados a crianza y turismo, sin embargo su lugar de hacinamiento era compartido con caballos carretoneros. A pesar de que no presentaban síntomas, todos los caballos resultaron

positivos para la detección de anticuerpos anti-influenza (Tabla 6). Lo que nos indica una exposición parcial al virus, que podría provenir de diferentes hospederos. Esto debido a que los caballos se encuentran en exposición a aves de corral (Patos, gallos, gallinas), cerdos, perros y aves silvestres por la intemperie de las caballerizas. De los 123 sueros colectados en el 2014, 114 (92.68%) resultaron positivos para la detección de anticuerpos anti-M1 pandémica (Tabla 6).

Equinos 2014			
Fecha colecta	Localidad	Total	Positivos
31/03/14	Montemorelos	1	1
31/03/14	Cadereyta	5	3
31/03/14	Zuazua	7	3
16 y 23/09/14	San Bernabé	81	78
11/09/14	Escobedo	2	2
28/11/14	San Nicolás	27	27
		Total: 123	114 (92.68%)

Tabla 6. Tabla de sueros equinos seropositivos al virus Influenza A muestreados en el año 2014.

Equinos 2011			
Fecha	Localidad	Total	Positivos
09/09/11	San Bernabé	88	76
10/09/11	San Bernabé	35	24
		Total: 123	100 (81.3%)

Tabla 7. Tabla de sueros equinos seropositivos al virus Influenza A muestreados en el año 2011.

No obstante, de los 123 sueros analizados de la colecta de caballos del 2011 obtuvimos que 100 (81.3%) eran positivos para Influenza A, lo que nos indica un aumento del 11.38% de la exposición del virus a la población equina de Nuevo León.

Entre tanto, se colectaron 82 muestras caninas en el Antirrábico de Guadalupe, el cuál recibe perros del municipio de Guadalupe y Juárez. Las condiciones de salud de los perros no fueron determinadas debido al escaso control del muestreo, sin embargo, tenemos la certeza de que estos perros no han sido previamente vacunados contra el virus Influenza A debido a que en México no se cuenta con vacuna canina contra este virus. Aunadas a estas muestras, se colectaron 41 sueros más en el Antirrábico de San Nicolás y de igual manera, no se cuenta con información adicional de estas muestras.

Caninos 2015			
Fecha	Localidad	Total	Positivos
16/02/15	San Nicolás (Antirrábico)	41	41
06/03/15	Guadalupe y Juárez (Antirrábico)	82	82
		Total: 123	123 (100%)

Tabla 8. Tabla de sueros caninos seropositivos al virus Influenza A muestreados en el año 2015.

De las 123 muestras de suero obtenidas de ambos antirrábicos, obtuvimos un 100% de la prevalencia de anticuerpos anti-influenza (Tabla 8). Cabe mencionar que el 95% de los perros muestreados eran callejeros, por lo que presentan una exposición superior al virus y otras especies animales en deplorables condiciones de salud.

Finalmente realizamos un análisis comparativo de las absorbancias obtenidas de los 3 grupos de animales analizados. Durante el ensayo de detección de anticuerpos se utilizó como blanco Suero Fetal Bovino, tras realizar el promedio de los blancos y su desviación estándar se determinó el cut off de las muestras para determinar su positividad. De manera que obtuvimos la siguiente gráfica donde observamos una incidencia superior de anticuerpos en caninos muestreados en el 2015, mientras que los sueros colectados en el 2011 de caballos, tienen una absorbancia muy por debajo de los sueros de caballos del 2014. Evidenciando aún más el aumento en la exposición del virus. (Figura 11).

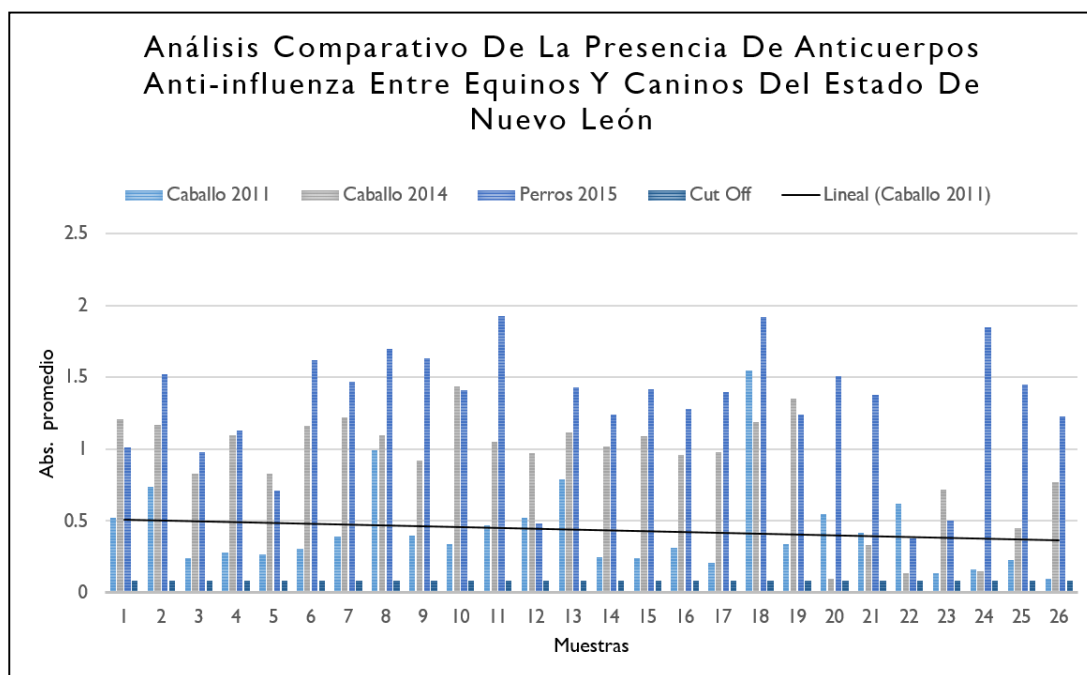


Figura 11. Análisis comparativo de los sueros obtenidos, marcando con una línea negra la tendecia de los sueros de caballos muestreados en el 2011.

7.3 DETERMINAR LA PRESENCIA DE ANTICUERPOS NEUTRALIZANTES DIRIGIDOS A LA PARTÍCULA VIRAL COMPLETA.

Para realizar una determinación de la presencia de anticuerpos neutralizantes, realizamos una propagación de una cepa vacunal A2/Kentucky/97 y la cepa de campo equino 4 en la línea celular Vero. Durante los ensayos de infección pudimos determinar que la monocapa celular de la cepa vacunal mostraba efectos citopáticos a las 14 horas pi, a las 24 horas pi, la monocapa celular presentaba un 45-60% de desprendimiento celular, por lo que a las 48 horas el desprendimiento de la monocapa era del 80-90% (Figura 12).

Por otra parte, la cepa de campo se presentaba más agresiva en la línea celular, de manera que a las 24 horas pi, se presentaba más de un 80% de desprendimiento celular (Figura 13). Durante los ensayos se evaluaron las características celulares del efecto citopático del virus sobre la monocapa celular, tales como el desprendimiento celular y la formación de sincitios.

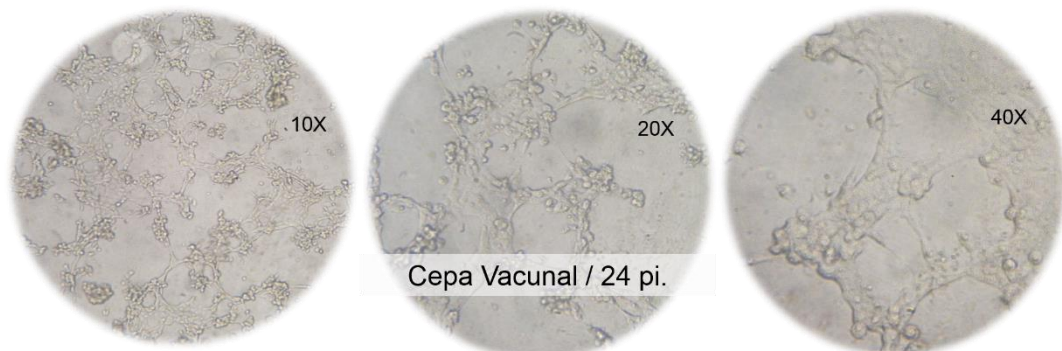


Figura 12. Propagación de cepa vacunal A2/Kentucky/97 en la línea celular VERO, a las 24 horas post infección.

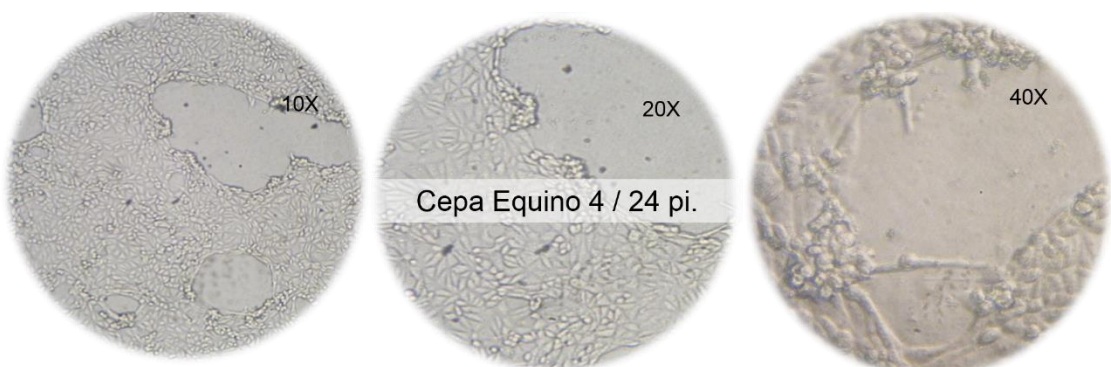


Figura 13. Propagación de la cepa Equino 4 en la línea celular VERO a las 24 post infección.

7.3.1 CUANTIFICACIÓN DE LAS PARTÍCULAS VIRALES

Para el posterior ensayo de neutralización, utilizamos dos métodos de cuantificación viral: Tinción con Inmunoperoxidasa y Ensayo en Placa. En el primer método, utilizamos dos anticuerpos para la estandarización de la técnica. El primero era un anticuerpo dirigido a la cepa vacunal humana y el segundo era un anticuerpo anti-M1 pandémico producido en conejo. El anticuerpo anti-vacuna humana reconocía de manera inespecífica tanto la monocapa como las células infectadas, mientras que al utilizar un anticuerpo anti-M1 pandémica producida en conejo, podemos observar una tinción específica de los focos.

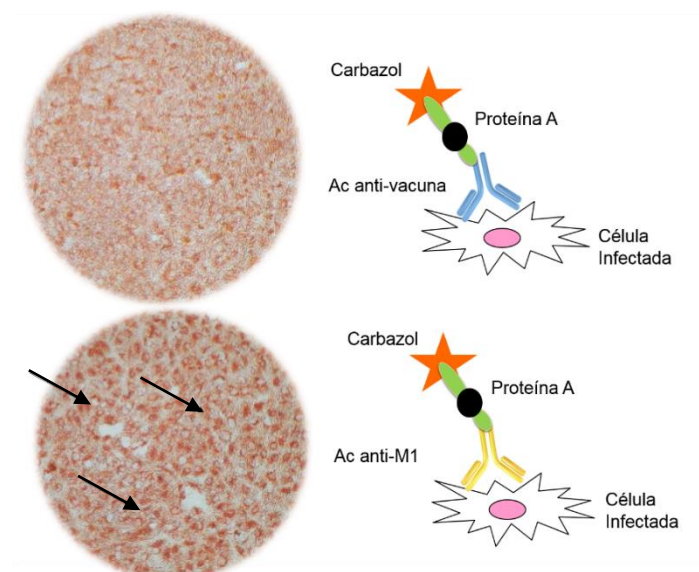


Figura 14. Tinción con Inmunoperoxidasa utilizando dos anticuerpos, en la imagen de abajo, vemos una tinción específicas de las células infectadas.

Y para el ensayo en placa, realizamos diluciones logarítmicas de las cepas e incubamos por 7 días para obtener placas líticas visibles.

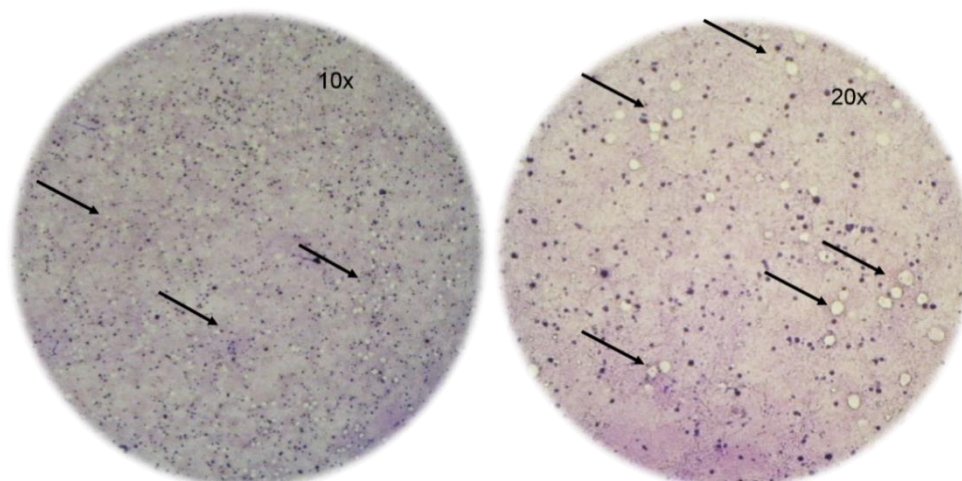


Figura 15. Tinción de ensayo en placa, donde observamos la formación de placas líticas.

Una vez determinado el título viral, ajustamos las concentraciones de anticuerpo-virus, para el ensayo de neutralización.

7.3.2 DETECCIÓN DE ANTICUERPOS NEUTRALIZANTES

Ajustamos la concentración a 150 – 200 UFP pozo de la cepa vacunal y de la cepa de campo, posteriormente realizamos diluciones de los dos anticuerpos anti-M1 pandémica y uno de los sueros positivos de equinos E23.

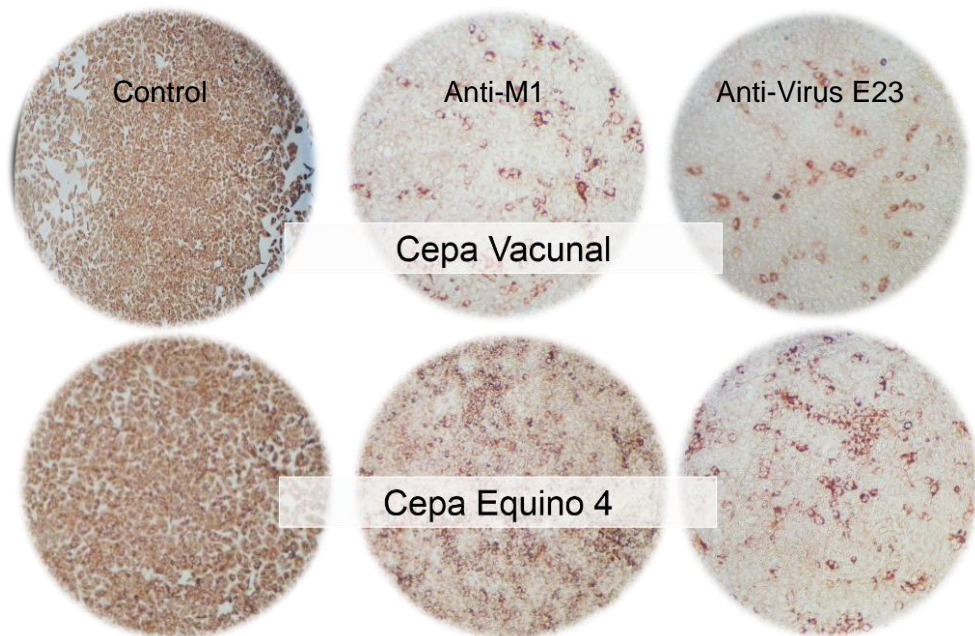


Figura 16. Ensayos de neutralización donde se observa la disminución de focos infecciosos a causa de la neutralización viral por anticuerpos.

Detección de anticuerpos neutrlizantes					
Cepa: A2/Kentucky/97			Cepa: Campo Equino 4		
Ac. Anti-M1 pndm	Ac. Anti-Virus E23	Cut Off	Ac. Anti-M1 pndm	Ac. Anti-Virus E23	Cut Off
80*	320*	110**	160*	640*	118**

Tabla 9. Análisis de la especificidad de anticuerpos neutralizantes contra las dos cepas de Influenza A propagadas en la línea celular VERO. *Recíproco de la dilución del suero donde existió 60% de reducción de focos infecciosos respecto a los controles **.

En este ensayo determinamos la capacidad neutralizante que tienen los anticuerpos dirigidos a M1 pandémica, de manera que observamos que tiene una capacidad neutralizante superior frente a la cepa de campo Equino 4 dilución 1:160 < 60% de focos, mientras que frente a la cepa vacunal tiene la capacidad hasta una dilución de 1:80 < 60% de focos. A diferencia del anticuerpo Anti-Virus E23 que tiene una capacidad neutralizante superior en la cepa de campo donde neutraliza en su mayor dilución 1:640 < 60% de focos.

8. DISCUSIÓN:

En el presente trabajo se evaluó el reconocimiento de anticuerpos anti-M1 sobre la neutralización viral de una cepa vacunal y un aislamiento de campo del virus Influenza A. Para ello, se colectaron 8 muestras de fluido nasal de caballos que presentaban síntomas característicos de gripe (Tos, fluido nasal, fiebre y anorexia) en los municipios de Cadereyta, Montemorelos, San Bernabé y San Nicolás. Se obtuvo RNA a partir de fluido nasal y biopsias de pulmón de caninos con un cuadro respiratorio agudo, esto en colaboración la Facultad de Veterinaria, UANL. A partir de estos aislamientos se amplificó la región de 244 pb del gen de la proteína M1, el cuál fue secuenciado para realizar un análisis de identidad que mostró que la cepa de campo Equino 4 presenta una homología del 86-88% con cepas aisladas de cerdo subtipo H1N1 y del linaje americano. Mientras que la secuencia de la cepa vacunal Kentucky/97 presenta una homología del 88% de cepas aisladas de cerdo subtipo H1N1 y H3N2 de los linaje europeo, asiático y americano. Estos resultados concuerdan con investigaciones de la evolución genética que presenta la proteína de matriz donde se muestra la divergencia genética entre cepas aisladas en el norte de Asia como en América del Norte (Furuse *et al.*, 2009). De esta manera corroboramos la presencia del virus en las muestras colectadas en el estado de Nuevo León esto a diferencia de trabajos previos donde sólo se ha determinado la seroprevalencia del virus (Blivitch *et al.*, 2010). De las secuencias obtenidas realizamos una deducción de aminoácidos, observando una carga prevalente de aminoácidos no polares en la secuencia de la proteína pandémica, así como aminoácidos con grupos aromáticos en la cadena “R” de la proteína vacunal Kentucky/97 y finalmente aminoácidos de carga positiva en la M1 de campo. Como bien sabemos la principal función de M1 es la estabilidad de la partícula viral, esto como resultado de su composición aminoacídica. Un aumento en la presencia de aminoácidos hidrofóbicos como son la glicina, alanina, leucina, tirosina y triptófano promueven la interacción de puentes de hidrógeno y conservan la estabilidad de la estructura proteica. Interacciones adicionales por la naturaleza de aminoácidos de carga positiva como la lisina y arginina en M1 podrían promover cambios en la funcionalidad debido a la interacción con enzimas catalíticas de la célula hospedera (Reinhardt y Wolff, 2000). La capacidad de cruzar la barrera entre especies que posee el virus ha cobrado importancia desde la caracterización de la cepa pandémica del 2009, debido a que el surgimiento de nuevas cepas

potencialmente peligrosas no sólo radica en los antígenos de superficie. Diversos estudios han hecho énfasis en las posibles combinaciones de segmentos, así como la presencia de epítopes de otras especies animales (Yan y Wu, 2010).

Durante el estudio detectamos anticuerpos anti-M1 pandémica de sueros colectados en el 2011, 2014 y 2015 de caballos y perros. De los sueros de caballos del 2011 obtuvimos una seroprevalencia del 81.3%, estos caballos fueron muestreados en una brigada de vacunación contra tétanos y donde no habían sido previamente vacunados contra Influenza A. En los caballos muestreados en el 2014 obtuvimos una seroprevalencia del 92.68%, de igual manera estos caballos eran carretoneros y fueron colectados durante una brigada de vacunación y no habían sido inmunizados, es por ello que deducimos que la exposición aumentó en el período de tiempo desde el primer muestreo (2011) a este último (2014). En cuanto a los sueros caninos colectados en antirrábicos obtuvimos un 100% de seropositividad, cabe mencionar que estos perros son callejeros, conviven con otras especies susceptibles a IA incluyendo la cepa humana 09H1N1 (Song *et al.*, 2015 y Hong *et al.*, 2014), por lo que son una posible fuente de zoonosis (Zhang *et al.*, 2015 y Ramírez *et al.*, 2014).

Finalmente para la detección de anticuerpos neutralizantes, propagamos la cepa vacunal equina A2/Kentucky/97 y la cepa de campo equino 4 a partir de fluido nasal, esto en la línea celular Vero. Las células a 14 pi presentaban desprendimiento celular y formación de sincitios, características morfológicas de una infección por influenza A (Youil *et al.*, 2004). Una vez realizado el análisis de la especificidad de anticuerpos neutralizantes observamos que tanto los anticuerpos anti-M1 pandémica, cómo los anticuerpos producidos por una infección natural en caballo, son neutralizantes frente a la cepa de campo y la vacunal. Los anticuerpos anti-M1 pandémica tienen una capacidad neutralizante hasta la dilución 1:80 frente a la cepa vacunal mientras que frente a la de campo 1:160. Mientras que los anticuerpos anti-virus producidos en una infección natural tienen una capacidad de neutralizar en una dilución 1:320 frente a la cepa vacunal y 1:640 frente a la cepa de campo, lo que nos dice que la población de equinos muestreados posee una inmunidad humoral protectora frente al virus. 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 necesario 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:

- Al menos un 29.41% de la población de caninos muestreada fue positiva para el virus Influenza A, así como un 75% de la población equina, afectando a diferentes poblaciones de animales en Nuevo León.
- Secuencias obtenidas de M1 poseen un 86% - 88% de homología con cepas aisladas de cerdos subtipo H1N1 y H3N2, pertenecientes al linaje americano, europeo y asiático.
- Estos resultados nos muestran un incremento en la incidencia del virus desde el 2011 al 2015, aumentando hasta un 11.38% la seroprevalencia de este virus en la población equina.
- Todos los caninos muestreados de los centros antirrábicos presentan una seroprevalencia del 100% de anticuerpos dirigidos a M1 de Influenza A.
- Anticuerpos dirigidos a la proteína de matriz M1 de la cepa pandémica poseen capacidad neutralizante frente a la cepa vacunal Kentucky/97 y la de campo Equino 4.
- Anticuerpos producidos durante una infección natural en equinos, poseen capacidad neutralizante frente a la cepa vacunal Kentucky/97 y la cepa de campo Equino 4.
- Estos resultados sugieren que mutaciones en la proteína de matriz M1 inducen un cambio en la neutralización viral por anticuerpos anti-influenza.

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. Arias CF, Lizano M, Lopez S. 1987. Syntesis in *Escherichia coli* and immunological characterization of a polypeptide containin the cleavaje sites associated with trypsin enhancement of rotavirus SA11 infectivity. *J Gen Virol*. 68:633-642.
3. Artz A, Baudin F, Barge A, Timmins P, Buemeister P, Ruigrok RW. 2001. Combined results from solutios 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.
4. Blitvich B, Root J y Franklin A. 2010. Seroprevalence of equine influenza virus in northeast and southern Mexico. *USDA National Wildlife Research Center*. 859:9.
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 Itracelular Localization with Monoclonal Antibodies. *Journal of Virology*. 63(9):3622-3633.
7. Burnell FJ, Holmes MA, Roiko AH, Lowe JB, Heil GL, White SK. Y Gray GC. 2014. Little evidence of human infection with equine influenza during the 2007 epizootic, Queensland, Australia. *J Clin Virol*. 59: 100-103.
8. Crawford PC, Dubovi EJ, Castleman WL, Stephenson I, Gibbs EP, Chen L, Smith C, Medina MJ, Johnson CM, Olsen CW, Cox NJ, Klimov AI, Katz JM. Y Donis RO. 2005. Transmission of Equine Influenza Virus to Dogs. *Science*. 482:482-485.
9. Cullinane A, Elton D. y Mumford J. 2010. Equine influenza – surveillance and control. *Influenza Other Respir Viruses*. 4: 339-344.
10. Elton D y Bryant N. 2011. HBLB's advances in equine veterinary science and practice: Facing the threat of equine influenza. *Equine vet. J*. 43(3) 250-258.

11. Furuse M, Suzuki A, Kamigaki T. 2009. Evolution of the M gene of the influenza A virus in different host species: large-scale sequence analysis. *Viro J.* 6:67-72.
12. Gaíva L, Borges AM, Villalobos EM, Lara MC, Cunha EM, Oliveira AC, Braga IA y Aguiar DM. 2014. Prevalence of antibodies against influenza virus in non-vaccinated equines from the Brazilian Pantanal. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo.* 56(6): 487-492.
13. Garten RJ, Davis C, Russell C, Shu B, Lindstrom S, Balish A, Sessions W, Xu X, Skepner E, Deyde V, Okomo-Adhiambo M, Guebareva L, Barnes J. 2009. Antigenic Characteristics of Swine-Origin 2009 A(H1N1) Influenza Viruses Circulating in Humans. *Science.* 325:197-201.
14. Giedt E. 2014. Respiratory Diseases in Horses: Overview of Respiratory Diseases of Horses. Manual Merck. Center for Veterinary Health Sciences. Oklahoma State University. (http://www.merckmanuals.com/vet/respiratory_system/respiratory_diseases_of_horses/overview_of_respiratory_diseases_of_horses.html).
15. 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.
16. 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.
17. 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.
18. Hong M, Na W, Yeom M, Park N, Moon H, Kang BK, Kim JK, Song D. 2014. Complete genome sequences of H3N2 canine influenza virus with the matrix gene from the pandemic A/H1N1 virus. *J Genom ASM.* (2):5,1-2.
19. Khurelbaatar N, Krueger WS, Heil GL, Darmaa B, Ulziimaa D, Trerennorov D, Baterdene A, Anderson BD y Grar GC. 2014. Little Evidence of Avian or Equine Influenza Virus Infection among a cohort of Mongolian Adults with Animal Exposures, 2010-2011. *PLOS ONE.* 9(1):1-6.
20. Landolt GA, Townsend HG y Lunn PD. *Equine Infectious Diseases (Sellon).* Capítulo 12: Equine Influenza Infection. 2014. Segunda Edición. ELSEVIER. ISBN 978 -1 – 4557 – 0891 – 8.

21. 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.
22. Mancini DA, Pereira AS, Mendonca RM, Kawamoto AH, Alves RC, Pinto JR, Mori E, Richtzenhain LJ y Mancini – Filho J. 2014. Presence of respiratory viruses in equines in brazil. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo*. 56(3): 191-195
23. 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.
24. 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.
25. 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
26. Medina RA y García AS. 2011. Influenza A viruses: new research developments. *Nature*. Macmillian Publishers Limited. 590-601.
27. 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*.
28. Noda Takeshi. 2012. Native Morphology of Influenza Virions. *Front Microbiol*. 2:296
29. 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.
30. 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.
31. 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.

32. Ramírez LA, Contreras M, De la Luz J, Manjarrez M, Rosete D, Rivera JF, Saavedra M, Ramírez H. 2014. Evidence of transmission and risk factors for influenza A virus in household dogs and their owners. *Influenza and Other Respiratory Viruses* 7(6): 1292-1296.
33. Reinhardt J, Wolff T. 2000. The influenza A virus M1 protein interacts with the cellular receptor of activate C kinase (RACK) 1 and can be phosphorylated by protein kinase C. *Vet Microb.* (74):87-100.
34. Rozek W, Polak M, Zmudzinski 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.
35. Sha B and Luo M. 1997. Structure of a bifunctional membrane-RNA binding protein, influenza virus matrix protein M1. *Nature*. 4:3.
36. Song D, Kim H, Na W, Hong M, Park SJ, Moon H, Kang B, Lyoo KS, Yeom M, Jeong DG, An DG, Kim JK. 2015. Canine susceptibility to human influenza viruses (A/pdm 09H1N1, A/H3N2 and B). *J Gen Virol.* (96):254-258. DOI: 10.1099/vir.0.070821-0.
37. 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.
38. Wise HM, Foeglein A, Sun J, Dalton RM, Patel S, Howard W, Anderson EC, Barclay WS y Digard P. 2009. A complicated message: Identification of a novel PB1-Related Protein Translated from Influenza A virus Segment 2 mRNA. *J. Virol.* 83(16):8021.
39. 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.
40. 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.
41. Yan S, Wu G. 2010. Evidence for Cross-species infections and cross-subtype mutations in Influenza A matrix proteins. *Viral Immunology.* (23):105-111. DOI: 10.1089/vim.2009.0080

42. 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.
43. 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.
44. Zhang Z, Shen Y, Du L, Wang R, Jiang B, Sun H, Pu J, Lin D, Wang M, Liu J, Sun Y. 2015. Serological survey of canine H3N2, pandemic H1N1/09, and human seasonal H3N2 influenza viruses in cats in northern China, 2010-2014. *Virol J.* 12:50. DOI: 10.1186/s12985-015-0285-5.
45. 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.
46. Zhiping Y., Baylor N. Wagner R. 1986. Transcription.inhibition and RNA-binding domains of influenza A virus matrix protein mapped with anti-idiotypic antibodies and synthetic peptides. *Journal of Virology.* 63, 3586-3594.
47. Zhiping Y., Robinson D., Wagner R. 1999. Nucleus-targeting domain of the matrix protein (M1) of influenza virus. *Journal of Virology.* 69, 1964-1970. Zhirnov O and Klenk H. 2002. Histones as Target for Influenza Virus Matrix Protein M1. *Journal of Virology.* 0042-6822/97.
48. 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 BIBLIOGRÁFICO:

Q. B. P. Claudia Bernardette Plata Hipólito

Candidata para el Grado de

Maestría en Ciencias con Orientación en Inmunobiología

Tesis: EVALUACIÓN DE ANTICUERPOS ANTI-M1 SOBRE LA
NEUTRALIZACIÓN DEL VIRUS INFLUENZA A

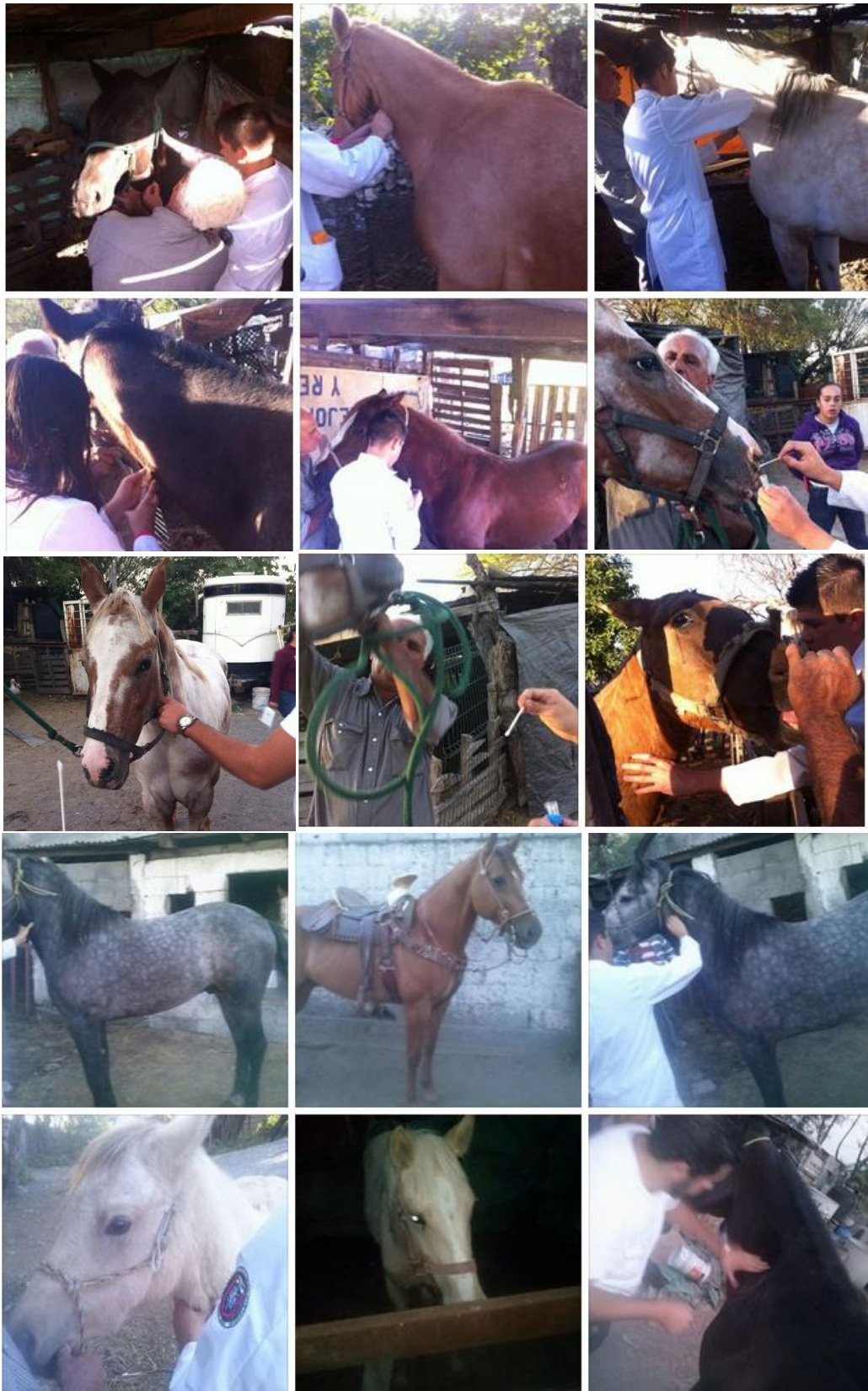
Campo de Estudio: Virología

Biografía:

Datos Personales: Nacida el 4 de Septiembre de 1991 en la Cd. De San Pedro Garza García, Nuevo León. Hija de Claudia Hipólito Martínez y José Luis Plata Hernández.

Educación: Egresada de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León con el título de Químico Bacteriólogo Parasitólogo en el 2013, con mención especial. Partícipe de 3 Congresos Internacionales y 9 Congresos Nacionales como ponente.

12.ANEXO



Evidencia de las colectas de equinos durante el período Marzo 2014 - Abril 2015 en diferentes municipios del estado de Nuevo León.