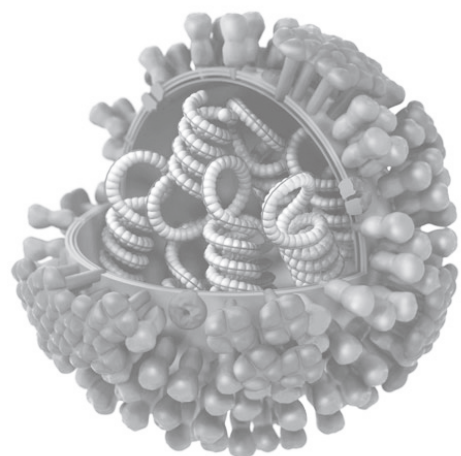


# INFLUENZA

Ángel Tato Jiménez - **VETERINARIO**



# ÍNDICE

|                                                                                        |           |
|----------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>INFLUENZAVIRUS</b>                                                                  | <b>4</b>  |
| <b>Microbiología</b>                                                                   | <b>4</b>  |
| <i>Caracteres generales:</i>                                                           | 4         |
| <i>Segmentos del genoma Vírico y Proteínas Codificadas:</i>                            | 4         |
| <b>Replicación:</b>                                                                    | <b>6</b>  |
| <i>Trímero Polimerasa:</i>                                                             | 6         |
| <b>Principales Especies Sensibles y Principales Influenzavirus:</b>                    | <b>7</b>  |
| <b>TRANSMISIÓN</b>                                                                     | <b>13</b> |
| <b>Adaptación de las HA y NA víricas a enlaces aviares/mamíferos</b>                   | <b>14</b> |
| <b>Adaptación y Transmisión entre Especies:</b>                                        | <b>15</b> |
| <b>Adaptación a los cambios de temperatura:</b>                                        | <b>16</b> |
| <b>Adaptación de las polimerasas víricas aviares a los nuevos huéspedes mamíferos:</b> | <b>16</b> |
| <b>RESPUESTA INMUNE/HOMEOSTASIA-MECANISMOS DE DEFENSA DEL INFLUENZAVIRUS</b>           | <b>17</b> |
| <b>Respuesta Inmune Adaptativa</b>                                                     | <b>18</b> |
| <i>Respuesta Inmune Celular:</i>                                                       | 18        |
| <i>Respuesta Inmune Adaptativa Humoral</i>                                             | 20        |
| <i>Generación de Anticuerpos (Guthmiller et al., 2021)</i>                             | 20        |
| <i>Activación de MBC y células B ingenuas tras exposiciones repetidas a IAV</i>        | 21        |
| <i>Factores que limitan la inmunidad humoral robusta y la inducción de bnAbs</i>       | 22        |
| <i>Competencia por Antígenos, ayuda con células T</i>                                  | 22        |
| <i>Neutralización por anticuerpos</i>                                                  | 23        |
| <b>FISIOPATOLOGÍA</b>                                                                  | <b>24</b> |
| <b>Activación de Vías de Señalización:</b>                                             | <b>25</b> |
| <i>Activación del Sistema Inmune del Animal infectado</i>                              | 27        |
| <i>Mecanismos de Defensa del IV</i>                                                    | 28        |
| <b>La Ubiquitinación en la Homeostasia Inmune y en la interacción Virus/Huésped:</b>   | <b>30</b> |
| <i>Interacción molecular IV/Huésped:</i>                                               | 30        |

|                                                                                                                          |           |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>LESIONES</b>                                                                                                          | <b>36</b> |
| <b>CONTROL</b>                                                                                                           | <b>39</b> |
| <b>Medidas de Higiene General</b>                                                                                        | <b>40</b> |
| <b>Monitorización:</b>                                                                                                   | <b>40</b> |
| <b>Profilaxis Prospectiva</b>                                                                                            | <b>40</b> |
| <b>Terapéutica</b>                                                                                                       | <b>40</b> |
| <b>Vacunas:</b>                                                                                                          | <b>42</b> |
| <i>Anticuerpos Policlonales:</i>                                                                                         | 44        |
| <i>Anticuerpos séricos preexistentes y enmascaramiento de epítomos</i>                                                   | 44        |
| <i>Consideraciones Generales en el Diseño de Vacunas</i>                                                                 | 45        |
| Elusión de epítomos variables de HA                                                                                      | 46        |
| Generación de Respuesta Celular:                                                                                         | 47        |
| <i>Valoración de vacunas:</i>                                                                                            | 47        |
| Pruebas de Inhibición de la Hemaglutinación                                                                              | 47        |
| Determinación de la persistencia de células Memoria                                                                      | 48        |
| <i>Vacunas de Nanopartículas:</i>                                                                                        | 48        |
| Escape del IV de las vacunas por Mutación                                                                                | 48        |
| <i>Vacunas en Cerdos</i>                                                                                                 | 48        |
| <i>Vacunas en Aves</i>                                                                                                   | 50        |
| Vacunas Aviares Autorizadas en Europa:                                                                                   | 50        |
| Tipos de Vacunas Aviares                                                                                                 | 50        |
| Indicaciones de la Vacunación antigripal de Aves:                                                                        |           |
| Estrategias Vacunales. Distintas Finalidades de Vacunas Aviares:                                                         | 51        |
| <b>Programas De Control/Vacunación:</b>                                                                                  | <b>52</b> |
| Medidas de Control de la Vacunación: Control de la Efectividad de las Vacunas Aviares. Evaluación de las Vacunas Aviares | 52        |
| <b>ESTRATEGIA DIVA:</b>                                                                                                  | <b>54</b> |
| <i>Medidas de restricción y mitigación de riesgos con la Influenza Aviar (EFSA, 2024)</i>                                | 57        |
| <b>Actuación Ante Brotes</b>                                                                                             | <b>57</b> |
| <b>BIBLIOGRAFÍA</b>                                                                                                      | <b>58</b> |

# **INFLUENZA**

## **BASES MOLECULARES**

### **DE LA TRANSMISIÓN INTERESPECÍFICA**

---

Los Influenzavirus A llegan hasta los humanos desde sus reservorios en otros animales, recorriendo una o más especies antes de llegar a la nuestra. Las pandemias gripales de 1918, 1957, 1968 y 2009 fueron causadas por influenzavirus, que a partir de sus reservorios aviáres o porcinos infectaron a humanos, adaptándose a nuestra especie, de forma que se replican efectivamente en esta y en consecuencia se transmiten horizontalmente en ella (Bailey et al., 2018). La infección por influenzavirus aviáres (IAV) supone un peligro significativo (Mänz et al., 2013). Las infecciones humanas por el IV aviar H5N1 pueden llegar a tener una tasa de mortalidad del 60% (Jiang et al., 2024).

Los Influenzavirus A y B se definen por sus hemagglutininas (HA) y por sus neuraminidasas (NA). Los más importantes son los A; de entre ellos solo 3 subtipos de HA (H1, H2 y H3) y 2 NA (N1 y N2) han causado epidemias humanas (Watanabe et al., 2014). Los virus de la gripe de los subtipos A/H1N1, A/H2N2 y A/H3N2 han causado cuatro pandemias de gripe humana desde 1918, y los virus H1N1 y H3N2 siguen circulando en humanos en todo el mundo (Kilbourne et al., 2006; Smith et al., 2009). Algunos Influenzavirus A que portan la HA de los subtipos H5 y H7 son altamente patógenos para las gallinas y han causado numerosos brotes de enfermedades en aves de corral de todo el mundo; además, los Influenzavirus A H5N1, H5N6, H7N7 y H7N9 también han causado graves infecciones y muertes humanas en diferentes países (Philippon et al., 2020). Los virus H9N2 y H10N8 también han infectado ocasionalmente a humanos (Chen et al., 2014; Peiris et al., 1999). Por lo tanto, los virus de la gripe siguen representando una amenaza para la salud humana y de otros animales (Qu et al., 2021).

## **INFLUENZAVIRUS**

### **MICROBIOLOGÍA.**

#### ***Caracteres generales:***

Los Influenzavirus (IV) pertenecen a la familia Orthomixoviridae. Existen 4 influenzavirus (IV): A, B, C y D, determinados por la secuencia de aminoácidos de la proteína de matriz M1 y de la nucleoproteína NP. Se trata de un virus segmentado con ARN monocatenario de sentido negativo (-ssRNA). Los IV A y B tienen 8 segmentos de ARN, los C y D poseen 7 (Bouvier et Palese, 2008).

Los IV A y B tienen HA y NA, los C y D tienen solo una glicoproteína de superficie, la hemagglutinina esterasa de fusión (HEF) (Su et al., 2017). Los IV B no codifican las proteínas PB1-F2 y PA-X, presentes en el virus gripal A, siendo la nucleoproteína B (NB) de su exclusividad (Koutsakos et al., 2016; Krammer et al., 2021).

## **Segmentos del genoma Vírico y Proteínas Codificadas:**

Los Influenzavirus A y B poseen 8 segmentos de ARN monocatenarios de sentido negativo (-ssARN); cada segmento de ARN está unido a la polimerasa vírica y a una nucleoproteína, este conjunto conforma la Ribonucleoproteína.

El segmento 1 codifica la proteína PB2 (polimerasa Básica 2).

El segmento 2 codifica la PB1. Solo algunas cepas de Influenzavirus A codifican la PB1-F2, que tiene actividad proapoptótica (Chen et al., 2001).

El segmento 3 codifica la polimerasa ácida PA. Tiene actividad endonucleasa y se encarga del corte de los RNAm del huésped para secuestrar CAP<sup>1</sup>, que se une al RNA transcrito del virus que se encuentra en sentido positivo, para ser reconocido por los ribosomas y actuar como RNAm. A ese proceso se le conoce como cap snatching.

El segmento 4 codifica la proteína de superficie Hemaglutinina (HA). La proteína HA se expresa como un precursor en el retículo rugoso RER, con un péptido señal en su extremo N-terminal que se procesa durante la traducción. La proteína resultante (HA0) queda anclada a la membrana del RER y oligomeriza formando trímeros durante la maduración. Finalmente, su procesamiento proteolítico a cargo de proteasas celulares origina dos polipéptidos independientes: HA1 y HA2, que permanecen unidos entre sí por un puente disulfuro. En los virus de influenza aviar, la hemaglutinina es producida por un precursor H0, que requiere un corte post-transcripcional por medio de proteasas para que las partículas del virus sean funcionales. El precursor H0 en los virus de baja patogenicidad tiene unido únicamente un residuo de arginina en posición 4; mientras que los virus de alta patogenicidad poseen múltiples aminoácidos, en este dominio. Este hecho facilita la replicación del virus en el hospedador, así como su análisis mediante técnicas moleculares (RT-PCR) en el diagnóstico (Kuiken et al., 2006; Liu et al., 2005; Olsen et al., 2006).

El segmento 5 codifica la Nucleoproteína (NP).

El segmento 6 codifica la proteína de superficie NA. Y en los Influenzavirus B codifica, en una segunda lectura la proteína de membrana integral NB, semejante a la M2 del IV A (Hatta et Kawaoka, 2003).

El segmento 7 codifica la proteína de matriz M1. En el IV A también traduce el canal iónico M2, mediante empalme de ARN (Cordero et al., 1981); en el IV B codifica su proteína de membrana BM2 en un marco de lectura alternativo (Howarth et al., 1990).

El segmento 8 codifica la proteína no estructural NS1, antagonista de IFN; mediante empalme de ARN codifica la Proteína de Exportación Nuclear (NEP) ó proteína no estructural NS2 (Lamb et al., 1980).

Los Influenzavirus C y D tienen un segmento menos, ya que la proteína HEF<sup>2</sup> hace las veces de las HA y NA. En el IV D la NEP vírica no se produce a través del empalme alternativo de ARNm de proteína no estructural (NS1).

Los Influenzavirus A codifican siete proteínas accesorias: PB1-F2, PB1-N40, PA-X, PA-N155, PA-N182, M42 y NS3<sup>3</sup> (Vasin et al., 2014).

---

1.- Nucleótido modificado de guanina (G) que protege al transcrito de la degradación. También ayuda al ribosoma a unirse al ARNm y a comenzar a leerlo para hacer una proteína.

2.- Proteína de fusión hemaglutinina-esterasa.

3.- PA-X endonucleasa que reduce la cantidad de ARNm del huésped y del IV; inhibe la producción de proteínas celulares, para utilizar la maquinaria celular para producir principalmente proteínas del IV. Modula la respuesta inmune del huésped.

PB1-N40, interacciona con 135 proteínas del huésped, especialmente con las Coatomer, implicadas en el tráfico de membrana (Wang et al. 2019) (codificada por el segmento 2).

## ● REPLICACIÓN:

La replicación del ARN vírico de la gripe depende de al menos dos polimerasas víricas (una replicasa y una encapsidasa), y el factor celular ANP32<sup>4</sup>.

Tras la unión de las HA del influenzavirus a los receptores celulares, ácidos siálicos unidos a galactosa mediante enlaces  $\alpha(2-3)$  y/o  $\alpha(2-6)$ , el IV ingresa en la célula a través de la endocitosis mediada por clatrina y con el concurso de la GTPasa Dinamina (Roy et al., 2000), requiriendo la ubiquitinación de la proteína adaptadora Epsina 1 (Chen et al., 2008). Los motivos de interacción de la ubiquitina de la Epsina 1 se unen a los receptores del virus ubiquitinados para facilitar la internalización (Park et al., 2022). La liberación de las ribonucleoproteínas víricas al núcleo celular requiere de ubiquitinas (Banerjee et al., 2014; Moreira et al., 2021).

El ciclo vírico intracelular requiere de la formación de ARN complementario (ARNc) y de ARN vírico genómico (ARNv). El ARN vírico infectante, de sentido negativo, debe formar un ARN vírico positivo, que será ARNm y se traducirá en proteínas del influenzavirus. Tanto el ARNc como el ARNv deben integrarse en ribonucleoproteínas (RNPC) para evitar la acción de las nucleasas y de los elementos del sistema inmune en la célula huésped.

Cada segmento de -ssRNA se asocia con una polimerasa vírica y nucleoproteínas oligoméricas (NP) para formar grandes complejos de ribonucleoproteínas (RNP) que dirigen la expresión de los genes víricos, y la replicación y el envasado del genoma del virus (Mehle et Culler, 2013; Fodor, 2013; Kirui et al., 2016). La capacidad del virus para expresar eficazmente sus genes y replicar su genoma es clave para una infección exitosa, ya que permite la modulación del entorno de la célula huésped por parte del virus para permitir el ensamblaje posterior de viriones de progenie. La transcripción y la replicación del genoma son realizadas por la polimerasa vírica. La polimerasa es un complejo de proteínas triméricas compuesto por las proteínas polimerasa ácida (PA), Polimerasa Básica 1 (PB1) y Polimerasa Básica PB2.

### **Trímero Polimerasa:**

Los -ssARN poseen extremos 5' y 3' en cada segmento de ARN vírico (ARNv) que se asocian con la polimerasa vírica (FluPol), mientras que el resto del ARN vírico se empaqueta en medio de la nucleoproteína vírica (NP), que se enrolla sobre aquel, para formar cada uno una ribonucleoproteína (vRNP).

Los genes víricos se transcriben mediante un proceso de “Cap-Snatching”<sup>5</sup> por el que la polimerasa PB2 vírica se adhiere a los preARNm del huésped y adquiere 11 a 13 nucleótidos de extremo 5', mediante la endonucleasa existente en la PA vírica; estos 7-metilguanosina (7mG) de los preARNm huéspedes son utilizados para iniciar la síntesis de ARNs mensajeros víricos (Dias et al., 2009; Guilligay et al., 2008; Kirui et al., 2016). El ARN corto resultante se utiliza para iniciar la síntesis de ARNm (vírico), por el sitio catalítico de la polimerasa, subunidad PB1. La transcripción continúa hasta el

---

PA-N155 y PA-N182 interactúan con UBA52 (proteína de fusión de ubiquitina y proteína ribosómica L40) (codificadas por el segmento 3).

M42 es una isoforma de M2, con la que colabora en el canal iónico (codificada por el segmento 7).

NS3 es una isoforma de NS1 y se asocia con la adaptación del influenzavirus a ratones (codificada por el segmento 8).

4.- Proteína Ácida Nuclear 32.

5.- El IV corta del ARN mensajero del huésped una región no codificante, la caperuza (CAP) (un nucleótido modificado que se añade al principio de los RNA mensajeros (mRNA) necesario para dirigir la maquinaria de síntesis de proteínas celulares al punto de inicio y así poder sintetizar nuevas proteínas en función de la información contenida en el mRNA) y lo utiliza como punto de inicio para generar una copia de ARN positivo que pueda ser leído por los ribosomas celulares.

final de la plantilla, donde una copia iterativa de un tracto poli(U) añade una cola poli(A) para completar la síntesis de ARNm (por tanto, todos los ARNm de IV tienen una corta sección en el extremo 5' que deriva de ARN del huésped). La polimerasa lleva a cabo la replicación del genoma durante la síntesis independiente del cebador de ARNc (complementario) de longitud completa, que sirve como molde para la producción de ARN vírico genómico nuevo (ARNv) (de sentido negativo).

La actividad de la polimerasa del Influenzavirus se ve afectada por el entorno de la célula huésped y se regula durante el curso de la infección (Subbarao et al., 1993); es decir, sirve principalmente como una transcriptasa al principio de la infección y más tarde actúa como replicasa (Robb et al., 2009). Las modificaciones postraduccionales (PTM) de las proteínas víricas por parte de las enzimas del huésped animal afectan a este cambio de actividad, mediante una serie de PTMs en NP y en subunidades de la polimerasa del IV, induciendo fosforilación de PB1, PB2, PA y NP (Robb et al., 2009) y sumoilación<sup>6</sup> de PB1 y NP (Pal et al., 2011; Han et al., 2014), la ribosilación por poli-ADP (PARilación)<sup>7</sup> de PB2 y PA (Liu et al., 2015), y la ubiquitinación de PB1 y NP (Liao et al., 2010; Fu et al., 2015). Estas modificaciones pueden afectar múltiples pasos en el ensamblaje y la función de las RNPs. La sumoilación de la NP determina su localización en el núcleo, mientras que su fosforilación conlleva su exportación al citoplasma (Han et al., 2014, Zheng et al., 2015; Neumann et al., 1997). También se ha demostrado que la fosforilación de la NP regula su homooligomerización y el ensamblaje de complejos de RNPs (Chenavas et al., 2013; Mondal et al., 2015; Turrell et al., 2015). Por lo tanto, la modificación dinámica y reversible de las proteínas en la RNP es un probable regulador de la transcripción y replicación del genoma.

## ● PRINCIPALES ESPECIES SENSIBLES Y PRINCIPALES INFLUENZAVIRUS:

- **Los Influenzavirus A** tienen un amplio espectro de hospedadores, aves y mamíferos. Sus reservorios naturales son aves de los órdenes Charadriiformes y Anseriformes. Desde ellas pueden pasar a aves de corral, a mamíferos marinos y terrestres.
- **Los Influenzavirus B** tienen su reservorio natural en el hombre. Se han detectado infecciones en focas y también se han aislados IV B de cerdos.
- **Influenzavirus C**, principalmente en humanos, aunque han sido aislados también de cetáceos y cerdos
- **Influenzavirus D**, forma parte del complejo respiratorio bovino, afecta a ovinos y caprinos; también a porcinos. Se han detectado casos, generalmente asociados a conjuntivitis en humanos.

**Equinos.** La influenza equina es altamente contagiosa para équidos, caballos, asnos y cebras. El subtipo H7N7 del EIV se notificó por primera vez en la década de 1950 y por última vez en la década de 1970. Actualmente se considera extinguido. El subtipo H3N8 del virus de la influenza equina se notificó primero en caballos en los Estados Unidos durante la década de 1960. Todavía hoy sigue propagándose entre los caballos de todo el mundo. Se notificó la presencia de otro subtipo del virus H3N8 en perros, caballos y aves, pero estos virus son diferentes en cada especie. El virus se propaga principalmente a través de gotas cuando un animal infectado tose o estornuda. El virus puede ingresar al organismo a través de los ojos, la nariz o la boca, o puede ser inhalado por otros caballos cercanos.

6.- **Modificación postraducciona**l mediante la cual algunas de las proteínas son covalentemente modificadas mediante la adición de otra pequeña proteína (de masa molecular 11 kDa) llamada SUMO (**s**mall **u**biquitin-related **m**odifier).

7.- **Modificación postraducciona**l de proteínas que consiste en el agregado de poli-ADP-ribosa (PAR) catalizado por poli-ADP-ribosil polimerasas (PARPs).

Los caballos pueden propagar el virus de la influenza equina incluso antes de mostrar signos de enfermedad. El virus de la influenza equina también puede propagarse indirectamente a través de objetos que estén contaminados por el virus, como indumentaria, equipamiento y cepillos. Si un caballo susceptible inhala, absorbe o ingiere el virus de un objeto, podría infectarse. El virus de la influenza equina también puede encontrarse en superficies donde se alojan o transportan animales infectados. Los síntomas típicos, tras la infección son: Fiebre (temperatura corporal elevada entre 39 °C y 41 °C), tos seca, sibilancias al respirar, pérdida de apetito, fatiga (cansancio), moqueo.

Según la Organización Mundial de Sanidad Animal, los virus de la influenza equina demostraron ser capaces de infectar a las personas en entornos experimentales. Sin embargo, ninguna de las personas expuestas a la influenza equina mostró signos de enfermedad.

## **Humanos.**

Los principales IVs estacionales que circulan en humanos son A(H1N1) y A(H3N2). H1N1 es de origen suino y posteriormente se adaptó a la especie humana, causando la pandemia de 2009 (CDC, 2023; Treanor, 2020).

Aitor Nogales (2024) asegura que Los saltos de virus de gripe entre humanos y cerdos no son eventos extraordinarios. Desde 2011, se han notificado 73 casos de infección por virus de la gripe porcina A(H1N1) en todo el mundo, dos de ellos en España (China es el país con mayor incidencia, con 42 casos notificados). Los virus de la gripe porcina circulan ampliamente entre los cerdos y la exposición humana directa a estos animales representa el factor de riesgo más común de infección. Por lo tanto, se pueden esperar contagios esporádicos, especialmente cuando las personas tienen contacto directo sin protección con animales infectados. La gripe porcina se transmite por vía aerógena mediante aerosoles y no por vía alimentaria.

El virus de la gripe aviar altamente patógena A/H5N1 puede causar morbilidad y mortalidad en humanos, pero hasta ahora no ha adquirido la capacidad de transmitirse por aerosol o gotitas respiratorias («transmisión aérea») entre humanos (Herfst et al., 2012). El IV aviar H3N8 ha causado síndrome de distrés respiratorio agudo y muertes en humanos; ha sido aislado de un paciente con neumonía grave y se replica eficazmente en las células epiteliales de las vías respiratorias; es muy virulento en mamíferos y se transmite experimentalmente por aerosoles en hurones, lo que indica su potencial epidémico/pandémico y epizootico (Sun et al., 2023). En China ha causado dos infecciones humanas en 2022 y un caso mortal en 2023. Se trata de un virus influenza muy extendido explotaciones aviares (pollos). Ha adquirido la capacidad de utilizar el receptor humano (mamífero), y ha realizado la mutación PB2-E627K, que le permite su transmisión aerógena. Los humanos vacunados frente al IV A/Human H3N2 se muestran susceptibles a la infección por el IV aviar H3N8 adaptado a mamíferos, que eventualmente podría tener expansión epidémica, incluso pandémica (Sun et al., 2023). En nuestra especie también se ha detectado la infección por otros virus aviares de menor trascendencia, H7N2, H7N3, y H7N5 (Zhuan et al., 2013) y por el altamente patógeno H7N7 (Fouchier et al., 2004; Zhuang et al., 2013; Puzelli et al., 2014).

## **Cerdo.**

En suinos europeos circulan simultáneamente tres subtipos del virus de la gripe porcina: los subtipos H1N1 y H3N2, presentes en la población porcina europea desde hace unos 30 años, y el subtipo H1N2, descrito por primera vez en Gran Bretaña en 1994 y presente en varios países del continente europeo desde 1998-2000 (Zoetis España, 2025). Este H1N2, tiene su HA proveniente del humano H1N1; su Neuraminidasa es del IV suino H3N2; en tanto que las proteínas internas provienen de reordenamientos anteriores del IV suino H1N1 y virus aviares H1N1. No obstante existe una gran diversidad genética y antigénica dentro de cada subtipo, (Vincent et al., 2014; Anderson et al., 2016,21).

Los IVs estacionales humanos también se contagian a los cerdos (Geiler et al., 2010; Nelson et al., 2012; Lewis et al., 2016).

IVs aviares en cerdos. los cerdos son altamente susceptibles a la infección con el clado derivado del visón 2.3.4.4b H5N1 HPAIV y proporcionan un entorno favorable para que HPAIV adquiriera adaptaciones similares a los mamíferos, pero no transmiten la infección experimental entre ellos; de hecho las adaptaciones que se consideran críticas para la adaptación a mamíferos, las PB2-E627K y HA-Q222L se dan con poca frecuencia en cerdos, tras la infección experimental; aunque provocó en ellos una neumonía intersticial con bronquiolitis necrotizante y altos títulos de virus presentes en el tracto respiratorio inferior y seroconversión del 100 % (Kwon et al., 2024). H7N9Zhuang et al., 2013; Jinyan et al., 2024).

### **Bóvidos.**

El clado 2.3.4.4b del influenzavirus aviar H5N1/H5N8 surgido en Europa entre cepas de alta patogenicidad y cepas locales aviares, produce infección y enfermedad en mamíferos (zorros, mapaches, gatos, perros, visones, focas). Mediante aves acuáticas se transporta a Norteamérica, África y Asia oriental (Xie et al., 2023; Byrne et al., 2022; Yang et al., 2023). A partir de marzo de 2024, se notifica la presencia de H5N1 de alta patogenicidad en vacas de leche en distintos estados de USA; todos pertenecen al genotipo B3.13 del clado 2.3.4.4b (USDA-VS/GenoFLUP). Los análisis genómicos indican que hubo un solo salto (Mallapaty, 2024) de ave a vaca hacia finales del 2023 y que a partir de ahí el virus se ha propagado dentro y entre rebaños a través de las máquinas ordeñadoras, aunque la vía aérea no está descartada (Sarukhan, 2024). A partir de abril se detectan casos humanos debidos a este genotipo, presentando conjuntivitis y algún signo respiratorio en algún individuo.

Resulta de un reagrupamiento genético H5N1 panzootico euroasiático y los genotipos norteamericanos de baja patogenicidad vistos por primera vez a finales de 2023. Las PA, HA, NA y MP se derivan del genotipo europeo y las PB2, PB1, NP y NS se derivan de los genotipos norteamericanos (Worobey et al., 2024). La clínica en vacas de leche corresponde a la de una enfermedad inespecífica, se aprecia ingesta reducida de piensos y disminución de rumia; caída abrupta de la producción lechera en animales afectados; la leche de la mayoría de las vacas afectadas tiene apariencia amarilla-cremosa y de aspecto espesado, similar al calostro. En las granjas afectadas, la incidencia alcanza su máximo a los 4, 6 días tras la aparición de los primeros síntomas, disminuyendo a los 10-14 días. Los signos clínicos se dan comúnmente en vacas multíparas durante la lactancia media a tardía; se observó una morbilidad del 10 al 15% de enfermedad y mortalidad muy escasa (Borrough et al., 2024).

Un IAV H5N1 2.3.4.4b ha saltado de aves de corral a cabras, en USA y es diferente del hallado en vacas (Ly et al., 2024). También se han infectado gatos al beber leche no termizada.

También se ha comunicado por parte del MAPA, el 26 de marzo de 2025, la infección de una oveja en el Reino Unido, por un IV aviar H5N1 de alta patogenicidad. La oveja convivía con aves, patos y gallinas, en las que se había detectado la presencia del virus.

### **Mustélidos.**

Los hurones, tienen una sensibilidad a la gripe semejante a los humanos, por lo que son utilizados como modelos de la influenza humana. Igual que los humanos pueden contagiarse de cerdos, humanos, otros hurones enfermos y aves. La infección por virus H1N1 de origen porcino y variante humana, se transmite eficazmente entre hurones por contacto directo, pero no por la exposición a gotitas en el aire, lo que sugiere que la transmisión sostenida en las poblaciones humanas sería limitada, como lo respaldan los hallazgos epidemiológicos (Rovida et al., 2017); sin embargo la propagación por vía aerógena del virus por los cerdos resultó en una infección por gotitas respiratorias de hurones susceptibles coalojados (van Diemen et al., 2023).

Los IVs aviáres de alta patogenicidad se transmiten a hurones y entre ellos. Todo parece indicar que la presencia de Lisina en la posición 627 de la PB2, hallada en un Turón europeo (EFSA, 2024), es favorecedora de la propagación aerógena del virus aviar H5N1, entre hurones. El A/H3N8 aviar infecta a hurones y se transmite entre ellos por vía aerógena, pudiendo provocar patologías severas. Esto parece debido a que la mutación PB2-E627K<sup>8</sup> es crítica para la transmisión aérea del virus H3N8 en hurones (Sun et al., 2023).

En los Visones, en octubre de 2022, se produjo un brote de influenza aviar altamente patógena (HPAI) A(H5N1) en una explotación gallega, con más de 50.000 visones. Los virus identificados pertenecen al clado 2.3.4.4b, responsable de una epizootia en Europa. Se encontró una mutación poco común en la PB2 (T271A)<sup>9</sup> que mejora la actividad de la polimerasa, de los virus de la influenza A en células huésped de mamíferos (Bussey et al., 2010). El aminoácido alanina en la posición 271 de la PB2 facilita al IV adquirir una mutación en la posición 226 de su HA (glutamina en vez de leucina ó glicina en vez serina), lo que confiere el reconocimiento del receptor mamífero (humano) con posibles implicaciones para la salud pública (Agüero et al., 2022). La evidencia experimental y de campo ha demostrado que los visones son susceptibles y permisivos a los virus de la influenza A tanto aviar como a los humanos, lo que lleva a la teoría de que esta especie podría servir como un posible recipiente de mezcla para la transmisión interespecífica entre aves y mamíferos (incluidos los humanos) (Agüero et al., 2023; Sun et al., 2021; Kiss et al., 2008).

### **Félidos.**

Los gatos pueden infectarse con virus de la gripe procedentes de otros gatos, aves y personas (IVs estacionales humanos); de hecho los gatos se infectan con los virus estacionales humanos H1N1 y H3N2 (Umar et al., 2024). La gripe se propaga en ellos del mismo modo que en las personas. La infección por el virus de la gripe suele provocar una enfermedad leve en los gatos (secreción nasal y ocular, dolor de garganta, babeo, úlceras bucales, estornudos, pérdida de maullido, fiebre), pero las infecciones por el virus de la gripe aviar en los gatos pueden provocar una enfermedad grave y la muerte. H7N2 en gatos se transmite con facilidad entre gatos, siendo posible su transmisión a personas (CDC, 2018).

La leche sin pasteurizar de vacas infectadas con virus H5N1 de alta patogenicidad, clado 2.3.4.4b, produjeron casos de influenza con evolución mortal en gatos en Kansas y Texas (USA) (Burrough et al., 2024).

Se notificaron infecciones en félidos del clado H5N1 2.3.4.4b en Finlandia, Francia, Polonia, Estados Unidos, Italia, Perú y Corea del Sur en 135 gatos domésticos, dos gatos monteses, un lince, un caracal y un león (Coleman et Bemis, 2024).

Panterinos también se infectan por la gripe aviar: tigres (Keawcharoen et al., 2004), leopardos, guepardos (Coleman et Bemis, 2024).

Los CDC<sup>10</sup> creen que la gripe felina supone un riesgo bajo para la salud humana, pero el riesgo podría variar en función del virus y de la exposición.

### **Cánidos.**

Los IVs se empezaron a detectar en perros en 2004, aunque parece ser que podrían haber estado circulando en esta especie desde 1999. Muchos perros (20-25%) no muestran signos clínicos; la mayoría presentan una forma leve de la enfermedad, pero entre un 1 y un 5% pueden desarrollar una forma grave de neumonía hemorrágica y morir.

8.- Sustitución del ácido glutámico en la posición 627 de la PB2 por Lisina.

9.- La treonina de la posición 271 de la PB2 es sustituida por Alanina.

10.- US Center for Diseases Control and Prevention.

En perros circula el IV H3N8, de origen equino. Existen cuatro diferencias en los aminoácidos de la proteína hemaglutinina en los virus equino y canino; es probable que estos cambios hayan tenido importancia en la adaptación del virus a los perros (Iowa State University College of Veterinary Medicine [www.cfsph.iastate.edu/IICAB/](http://www.cfsph.iastate.edu/IICAB/)). Un IV de origen aviar, H3N2, también circula en perros, tras haberse adaptado a esta especie. Ocasionalmente se ha detectado el IV aviar H5N1 (Giese et al., 2008; CDC 2024). La gripe aviar por H5N1 también puede afectar a perros y causar enfermedad grave en ellos (López, 2024).

## Cetáceos.

En mamíferos marinos se han detectado IVs (H1, H3, H4, H5, H7, H10 y H13) y, en todos menos en H1N1, muestran una fuerte evidencia de derivar directamente de fuentes aviares (Runstandler et al. 2020; Leguia et al., 2023).

**León Marino.** La infección por el IV aviar de alta patogenicidad fue detectada en miembros de esta especie por Leguia et al. en 2023, en Perú. Los IVs A/H5N1 aviares en leones marinos y delfines peruanos tienen sus proteínas PA, HA, NA y MP procedentes del linaje euroasiático que entró inicialmente en Norteamérica desde Europa y Asia, mientras que los otros 4 segmentos genómicos (PB2, PB1, NP y NS) pertenecen al linaje americano (clado C) que circuló en Norteamérica (Leguia et al., 2023).

**Delfines.** Murawski et al (2024) publican un caso de influenza en un delfín mular (*Tursiops truncatus*) por un IV de alta patogenicidad A(H5N1) del clado 2.3.4.4b, en Florida (Estados Unidos). Observaron meningoencefalitis con necrosis neuronal. La RT-PCR cuantitativa en tiempo real puso en evidencia la alta carga vírica del cerebro del animal. El IV aislado del cerebro presenta una mutación S246N<sup>11</sup> en su neuraminidasa (que reduce su sensibilidad al inhibidor de la neuraminidasa oseltamivir).

**Ballenas.** En ellas se han aislado gripe A de los subtipos H13N2 y H13N9 en el pulmón y el ganglio hiliar de un calderón común (o ballena piloto de aleta larga, *Globicephala melas*). Estos IVs están estrechamente relacionados con los virus H13 procedentes de gaviotas (Hinshaw et al., 1986). El IV aviar H5N1 de alta patogenicidad ha sido aislado de ballena barbada, de ballenas rorcual (*Balaenoptera acutorostrata*) (Reperant et al., 2009; Groth et al., 2014).

**Focas.** Se ha detectado anticuerpos contra el IV B en especies de otáridos y fócidos. En la foca de puerto (*Phoca vitulina*) y foca gris (*Halichoerus grypus*) (Osterhaus et al., 2000; Blanc et al., 2009, se han detectado tanto influenzavirus A como B, (Ohishi et al., 2002), incluido el IV aviar altamente patógeno H5N1 (Uhart et al., 2024; Puryear et al., 2023).

**Cachalotes.** 14 especímenes (*Physeter macrocephalus*) y 2 cachalotes pigmeos (*Kogia breviceps*) se detectaron anticuerpos contra IV A (Ohishi et al., 2006).

En otros odontoceros, marsopa en Noruega, se ha detectado la presencia de IV aviares.

## Múridos.

Se ha detectado IV aviar de alta patogenicidad H5N1 en 11 ratones de granja (*Mus musculus*) en Nuevo Méjico (USA), por el Departamento de Agricultura (Sarukhan, 2024).

## Quirópteros.

El sistema inmune quiróptero ha evolucionado para limitar la respuesta inflamatoria a la infección vírica, impidiendo los daños que para su organismo se desprenden del fenómeno inmunopatológico. Así es capaz de atenuar la funcionalidad del inflammasoma NLRP3 (Ahn et al., 2019), de modo que toleran la

11.- La Serina es sustituida por la Asparagina en la posición 246 de la Neuraminidasa.

infección vírica sin manifestar signos de enfermedad (Fischer et al., 2020). Para evitar la excesiva multiplicación vírica los murciélagos han desarrollado un incremento de la producción de los tres tipos de interferones (incluso en ausencia de infección vírica), respecto de otras especies de mamíferos, de modo que pueden controlar la proliferación vírica, en caso de infección (Zhou et al., 2016), sin necesidad de activar la inmunidad específica y producción de anticuerpos (Fischer et al., 2020). Por otro lado, este fenómeno de sobreproducción básica de interferones induciría en los virus, que queden en los tejidos de los quirópteros, un mecanismo de modulación de los interferones sin producción de anticuerpos (Shountz et al. 2017) (probablemente coadyuvado por las proteínas no estructurales del virus). Además para evitar un excesivo daño tisular por parte del exceso de IFN, los murciélagos han evolucionado su estimulador de genes inducidos por IFN (STING), mediante sustituciones de genes en la vía de señalización de este (Pavlovich et al., 2018). Una de las citoquinas que producen mas daño tisular es el factor de necrosis tumoral (FNT); algunas especies de murciélagos (*Eptesicus fuscus*) han desarrollado un sistema que disminuye la producción de FNT, que consiste en que el c-Rel interactúa con la secuencia promotora de FNT, restringiendo su transcripción (Banerjee et al., 2017, 20).

Los IVs de estos animales son diferentes a los de otros mamíferos y aves. Los hallados en murciélagos hallados poseen las hemaglutininas H17 y H18 (Tong et al., 2012,13). La otra proteína de superficie de los virus de la influenza en murciélagos, la neuraminidasa (NA), también es diferente al de los virus de la influenza conocidos, son la NA10 y NA11.

Tong et al. (2012) descubrieron IVs A en el pequeño murciélago de hombros amarillos *Sturnira bidens*, en Guatemala en los años 2009 y 2010). Se ha observado la presencia de IV quiróptero H18N11 en murciélagos frugívoros (*Artibeus lituratus* y *A. jamaicensis*) (Campos et al., 2023; Kessler et al., 2024) y en los murciélagos vampiro comunes (*Desmodus rotundus*) que parecen ser el reservorio de este IV quiróptero y que evidencia su capacidad de transmisión a otras especies de murciélagos (Megan et al., 2025), quizás favorecido por las características propias del sistema inmune quiróptero.

Las investigaciones de laboratorio realizadas en los CDC y en otros lugares sugieren que los virus de la influenza en murciélagos tendrían que cambiar significativamente para poder infectar y propagarse fácilmente entre los seres humanos.

## Aves.

En las especies aviares hay que distinguir entre IVs A de alta y baja patogenicidad.

- **Influenza Aviar de Alta Patogenicidad (IAAP):** Virus de la influenza aviar de los subtipos H5 o H7 con una secuencia genómica, codificadora de múltiples aminoácidos básicos en el punto de corte de la hemaglutinina. También IVs cuyo índice de patogenicidad intravenosa sea superior a 1,2 en pollitos de 6 semanas de edad.
- **Influenza Aviar de Baja Patogenicidad (IABP):** toda infección de las aves de corral u otras aves cautivas causada por virus de la influenza aviar de los subtipos H5 o H7 que no entren en la definición de IAAP.

La mayoría de los influenzavirus aviares (subtipos H1-H16) son de baja patogenicidad. Sin embargo, algunos de los influenzavirus H5 y H7 de alta patogenicidad resultan altamente letales para pollos, pavos y aves de corral gallinaceas. En la mayoría de las aves silvestres, las infecciones por IV A son subclínicas, excepto algunas infecciones aviares producidas por virus de alta patogenicidad H5N1, que pueden producir enfermedad clínica y muerte en grullas (*Grus grus*) en Israel (2021) buitres pavo negro (o buitre americano) (*Cathartes aura*) (EE.UU.; 2022), varias especies de pelícanos (*Pelecanus spp*) (2022-2024) y varias especies de pájaro atún (*Artamus minor*) (2023). Las aves infectadas pueden diseminar los virus de influenza aviar A por medio de la saliva, las secreciones nasales y las heces.

El estudio de los brotes muestra eventos clave de resurgimiento en 2016-2017 y 2020-2021, que contribuyeron a la aparición y propagación panzootica del H5N1 en 2021-2022. El análisis genómico revela que las epizootias de 2016-2017 se originaron en Asia, donde los reservorios de IAAP H5 son endémicos. En 2020-2021, surgieron virus H5N8 2.3.4.4b en aves de corral africanas, con mutaciones que alteran la estructura de la HA y la unión al receptor. En 2021-2022, un nuevo virus H5N1 evolucionó por reagrupación en aves silvestres en Europa, sufriendo una nueva reagrupación con la gripe aviar de baja patogenicidad en aves silvestres y domésticas durante la diseminación global. La Influenza aviar de alta patogenicidad, H5, se extiende desde Asia mediante aves silvestres, expandiéndose por Europa y América, afectando a aves domésticas y de corral. El incremento del espectro de hospedadores facilita los fenómenos de reagrupamiento genético entre distintos IVs aviáres y aumenta la velocidad de dispersión. Dado que los brotes anteriores de H5N1 y H5N8 fueron causados por constituciones genómicas más estables, estos cambios recientes reflejan la adaptación a través de la interacción entre aves domésticas y silvestres. Por tanto, las estrategias de eliminación en aves domésticas siguen siendo prioritarias para limitar futuras epizootias (Xie et al., 2023).

Patos: En la gripe aviar, tanto epizootica como zoonótica, juega un papel primordial el pato (*Anas acuta*), la cerceta alialzul (*Spatula discors*), que pueden ser portadores asintomáticos de todos los influenzavirus, excepto las H13, H16, H17 y H18 y Neuraminidasas 10 y 11 (Wu et al., 2014; Munster et al., 2007).

IV aviar H5N1. En 1996 es identificado un linaje altamente patógeno, Gs/GD/96, del influenzavirus aviar H5N1 (Okuya et al., 2022; WHO, 2014). Muchas reordenaciones entre Influenzavirus aviáres han introducido distintos genes para Neuraminidasa (NA) en el original H5N1 asiático de alta patogenicidad para aves: H5N2, H5N5, H5N6 H5N8, H5N9 (Zhao et al., 2013; Gu et al., 2013).

Dos subgrupos genéticos de virus HPAI H5N1/H5N8, G2a y G2b, cocirculaban entre las aves acuáticas migratorias en Asia entre 2021 y 2022. A la vez en Europa circulaban Influenzavirus de Alta Patogenicidad (HPAI) H5 integrando un único Clúster G2c, originando brotes de infecciones de alta patogenicidad en Europa desde octubre de 2021 (Okuya et al., 2022). Estos IAVs H5N1/H5N8 pertenecen al Clado 2.3.4.4b.

### **Distinta susceptibilidad y expresión clínica de enfermedad Influenza en especies aviáres:**

- Gallinas y pavos MUY ALTA
- Codornices, gallina de Guinea y faisanes MUY ALTA
- Patos y gansos ALTA
- Avestruces y emús BAJA
- Pájaros de jaulas NO AISLADO
- Otras aves AISLADO

## **■ TRANSMISIÓN**

Los IV A e IV B tienen diferencias significativas en la evolución y epizootiología/epidemiología; la diversidad limitada de subtipos y el reordenamiento de genes pueden ser la razón del rango de huéspedes más estrecho de IV B (Huang et al., 2014). Los IV B tienen una estructura genómica similar a los IV A y en ellos también se produce la deriva antigénica de HA, pero es más lenta que en los IV A. El hospedador de Influenzavirus B es fundamentalmente el humano, aunque también se han descrito infecciones por este Influenzavirus en foca común (Ramis et al., 2012) y hurones (Huang et al., 2014), además de cerdos. El linaje Victoria ha mostrado su capacidad para unirse a los receptores

celulares  $\alpha$ -2,3 y  $\alpha$ -2,6; mientras que el linaje Yamagata lo hace exclusivamente a  $\alpha$ -2,6 del tracto respiratorio (Reina et al., 2022).

Las epidemias de gripe generalmente ocurren cuando un IV A de animales entra por primera vez en la población humana, que carece de memoria inmunológica frente a aquel. Esto a menudo se ve facilitado por el cambio antigénico, que es consecuencia del reordenamiento de segmentos génicos entre 2 IVs diferentes. Suele ocurrir en cerdos que pueden estar infectados por virus aviáres y humanos a la vez (Lakdawala et al., 2015), además de los IVs que normalmente circulan entre ellos.

Los virus de la gripe aviar a menudo se propagan a las aves de corral, en las que múltiples subtipos de IV A circulan actualmente por todo el mundo, incluidos el H7N9 y el H5N1, que representan la mayor amenaza para la salud pública (Su et al., 2015). Y estos H5N1, H7N9 saltan la barrera de especie, hasta llegar a los humanos, directamente o mediante la adaptación a otros mamíferos, principalmente suinos, que a su vez infectarían a los humanos.

## ● ADAPTACIÓN DE LAS HA Y NA VÍRICAS A ENLACES AVIÁRES/MAMÍFEROS:

La primera dificultad que encuentran los influenzavirus aviáres para infectar cerdos, hurones, humanos, mamíferos en general, es el enlace de unión al receptor de la superficie de la célula epitelial. Los virus aviáres se combinan con los ácidos siálicos que se unen a la galactosa de la membrana celular mediante enlaces  $\alpha$ (2-3). Esta clase de receptores solo se encuentran en las células bronquiales no ciliadas, en las células alveolares y en la conjuntiva de los humanos. También los tienen los cerdos. Las hemaglutininas de los virus humanos y de otros mamíferos reconocen el ácido siálico unido a la galactosa de la superficie de la célula epitelial mediante enlace  $\alpha$ (2-6), el cual se puede encontrar en las células epiteliales de la mucosa nasal y paranasal, faringe, tráquea, bronquios y bronquiolos. Ahora bien, determinados influenzavirus aviáres consiguen adaptarse al enlace mamífero, lo que les permite la evasión de la barrera de especie y además posibilita la transmisión horizontal entre especies mamíferas, hombre incluido. Xiong et al, (2013) desarrollan un algoritmo que es capaz de determinar la avidez de una hemaglutinina por un tipo de receptor, mamífero o aviar. En este experimento, seleccionando cepas de influenzavirus aviar H5N1 capaces de infectar a hurones, observan que el incremento de la avidez por el receptor mamífero es inversamente proporcional a la avidez por el receptor aviar. Esto también tiene otras consecuencias, ya que los influenzavirus aviáres no quedan retenidos por las mucinas, en las que abundan los ácidos siálicos con enlaces  $\alpha$ (2-3), al haber perdido la capacidad de unión a estos enlaces tipo aviar; lo cual favorece la progresión de los influenzavirus hacia los pulmones y también la transmisión horizontal entre los hurones (modelo patológico para los humanos). La baja capacidad de unión al receptor humano (en comparación con influenzavirus pandémicos y otros influenzavirus que circulan normalmente entre humanos), se verá compensada por la mayor carga vírica. Además, humanos y otros mamíferos tienen enlaces de tipo aviar en neumocitos tipo 2 (Shinya et al., 2006) y en las células ciliadas del epitelio respiratorio (Matrosovich et al., 2004) e incluso en la mucosa faríngea (Nicholls et al., 2007). Por otro lado, el nuevo virus formado para convertirse en virión, es decir para tener capacidad infectante de nuevas células debe separarse de la membrana de la célula en la que se ha producido y a la que queda unida tras su brotación mediante la HA; ello se realiza merced a la Neuraminidasa; para ello esta NA debe tener enlaces compatibles con el nuevo virus, si el nuevo virus ha mutado y ha adquirido la capacidad de unirse a los enlaces tipo mamífero, la NA, si mantiene los enlaces aviáres  $\alpha$ (2-3), no podrá escindir la HA de la membrana citoplasmática, es decir debe haber mutaciones en la NA que le den la capacidad de utilizar enlaces  $\alpha$ (2-6). La especificidad de especie viene dada por los residuos 226 y 228; la HA adaptada a aves tiene Q226 y G228, mientras que la adaptada a humanos tiene L226 y S228 (Connor et al., 1994; Carter et al., 2024). Las mutaciones simultáneas Q226L y G228S ensanchan la RBS, permitiendo que la base,

más grande, de la  $\alpha(2,6)$  con avidez al ácido acetil neuramínico humano se una al sitio de unión al receptor de la hemaglutinina (RBS) (Ha et al., 2003).

Por otro lado, en humanos se han detectado rastros de ARN de influenzavirus A estacionales en heces. Sin embargo los humanos carecen de receptores tipo mamífero en su intestino, tanto delgado como grueso; por lo que los influenzavirus A/H1N1 y A/H3N2 no pueden infectar las células epiteliales intestinales (Chan et al, 2011). Ahora bien, Células Dendríticas (las cuales portan el receptor DC-SIGN) y Macrófagos Monocitos (que exhiben el clúster de diferenciación CD68) en el intestino delgado e intercaladas en la lámina propia, en particular, estas células con capacidad de adherir virus, están localizadas más abundantemente en la región de las criptas y en la submucosa, especialmente alrededor de la región del domo de las placas de Peyer y portan enlaces  $\alpha(2-6)$  (Chan et al., 2013). También en el colon humano se ha detectado la presencia de enlaces aviares  $\alpha(2-3)$  (Chan et al., 2013).

## ● ADAPTACIÓN Y TRANSMISIÓN ENTRE ESPECIES:

Los IVs están adaptados a una especie animal determinada, pero ocasionalmente pueden saltar de una especie a otra, infectar a un individuo de una especie distinta; pero la adaptación a la nueva especie es muy difícil, por lo que la mayoría de las infecciones se limitan a un individuo o reducido grupo de individuos. La adaptación permanente a una nueva especie es infrecuente. Cuando ocurre se basa en la alta tasa de mutación de los IVs y en su capacidad de recombinación entre ellos.

Aunque los déficits en producción/actividad de IFN podrían incrementar la carga vírica, la evidencia señala a una pieza fundamental para que pueda ocurrir el salto de especies: la ausencia o la deficiencia de la proteína IFITM3 (Denz et al., 2023). Denz et al. (2023) demuestran que la deficiencia de IFITM3, por sí sola facilita las infecciones por virus de la gripe zoonótica y la posterior adaptación, posibilitando las transmisiones interespecíficas y pudiendo dar origen a pandemias.

La proteína transmembrana 3 inducida por IFN (IFITM3) juega un papel primordial en la infección, adaptación y transmisión interespecífica de influenzavirus (Denz et al., 2023). Ratones y humanos deficientes en IFITM3 se infectan con dosis bajas del influenzavirus aviar H5N1. La deficiencia de IFITM3 facilita las infecciones por virus de la gripe zoonótica y la posterior adaptación, lo que implica que las deficiencias de IFITM3 en la población humana son un factor de vulnerabilidad para la aparición de nuevos virus pandémicos. (Denz et al., 2023).

El dominio transmembrana de IFITM3 es anfotérico, lo que le permite variar la composición y estructura de la membrana celular y por tanto bloquear el vertido del genoma vírico al citoplasma (Unali et al., 2023). IFITM3, presente en endosomas y lisosomas induce el incremento de lípidos, lo que estabiliza la hemifusión entre partículas víricas y membranas endosomales tardías, ya que al incrementar la duración de la hemifusión, permite la degradación vírica en los lisosomas; es decir bloquea la entrada de virus en las células diana. (Klein et al., 2023). La proteína transmembrana 3 inducida por interferón (IFITM3) es codificada en humanos por un gen que posee un polimorfismo de dos PSNs; cuando existen estos dos polimorfismos de nucleótido único impiden la acción antivírica de la proteína IFITM3 (Everitt et al, 2012; Zani et al., 2018). Estos SNPs son comunes en la población humana: el 20% de los chinos son homocigóticos para el SNP de empalme (rs12252-C) y el 4% de los europeos son homocigóticos para el SNP promotor (rs34481144-A) (Zani et al., 2018). La proteína IFITM3 suina (sIFITM3) contiene el dominio funcionalmente conservado CD225, que comparte con su ortólogo humano los residuos (Y19, F74, F77, R86 e Y98) y que son esenciales para la actividad antivírica de esta proteína. En el cerdo el gen para IFITM3 codifica 148 aminoácidos (Li et al., 2017); la mayor expresión de este gen porcino tiene lugar en bazo y pulmones.

## ADAPTACIÓN A LOS CAMBIOS DE TEMPERATURA:

Los influenzavirus aviaries en sus hospedadores naturales, las aves de corral están a temperaturas de 40-5°C; en las vías respiratorias superiores de los mamíferos la temperatura es sensiblemente más baja; es decir los virus deben salvar esta dificultad en el salto de barrera de especie y lo hacen mutando. Así la infección de las mucosas de las vías respiratorias superiores humanas por influenzavirus aviaries, se ve dificultada por la incapacidad de estos virus de aves para replicarse a temperaturas de 32°C, relacionado con la presencia en la posición 627 de la PB2 de Ácido Glutámico en los H1N1, H2N2 y H3N2, mientras que la PB2 de las cepas humanas de estos mismos influenzavirus tiene en esta posición Lisina (Scull et al., 2009). También las NAs de los influenzavirus aviaries tienen su máxima actividad a temperaturas de 40°C, mientras que las de influenzavirus humanos requieren temperaturas inferiores (Baigen et McCauley, 2003; Fiszson et al., 1989).

## ADAPTACIÓN DE LAS POLIMERASAS VÍRICAS AVIARES A LOS NUEVOS HUÉSPEDES MAMÍFEROS:

Otra dificultad que deben superar los influenzavirus aviaries para infectar a mamíferos es adaptar sus polimerasas a éstos.

Las proteínas ANP32A codificadas en el hospedador son necesarias para apoyar la actividad de la polimerasa del virus de la gripe A, y las diferencias entre especies en ANP32A pueden restringir el rango de hospedador del virus de la gripe (Mistry et al., 2020). La polimerasa del virus de la gripe A de origen aviar está restringida en las células mamíferas. Las diferencias entre especies animales de la familia de fosfoproteína ácida 32 (ANP32A, B y E) pueden restringir el rango de huésped del virus de la gripe. La ANP32A aviar ayuda a la actividad de una polimerasa de influenzavirus de origen aviar. Sin embargo, la polimerasa de origen aviar es incompatible con la ANP32A humana y especies mamíferas en general. La replicación de IV aviaries en células de mamíferos se ve obstaculizada por la variación específica de especie, en las proteínas ácidas de fosfoproteína nuclear 32 (ANP32), que son esenciales para la replicación del genoma del ARN vírico. Las proteínas ANP32A de las aves albergan 33 aminoácidos adicionales en comparación con las proteínas ANP32A mamíferas (Staller et al., 2024) y que son cruciales para su capacidad de colaborar con la polimerasa del virus de la gripe de origen aviar (Mistry et al., 2020). ANP32B interactúa con la subunidad PA de la polimerasa del influenzavirus aviar (FluPolA) en su forma monomérica, en el sitio utilizado para su acoplamiento en el dominio C-terminal de la ARN polimerasa II del huésped durante la transcripción vírica. ANP32B actúa como cofactor, guiando a la polimerasa ácida del influenzavirus aviar (FluPolA) a una asociación con ribonucleoproteínas para formar un dímero asimétrico, la plataforma de replicación para el genoma del IV. La adaptación más común en la polimerasa vírica de origen aviar, para superar la restricción en las células de mamíferos, es la mutación E627K<sup>12</sup> en la subunidad PB2 de la polimerasa (Almond, 1977; Subbarao et al., 1993; Mistry et al., 2020).

La adaptación de la polimerasa aviar dependiente de ARN a las células mamíferas requiere unas adaptaciones para poder utilizar el cofactor ANP32. La mutación general en mamíferos de la posición 627 de la PB2 por la que el ácido glutámico es sustituido por la Lisina (E627K) no se ha observado en bovinos, excepto en una variante de IAV que infectó a una vaca de Kansas (Nguyen et al., 2024). Sin embargo se ha detectado la mutación M631L (leucina en vez de metionina) de la PB2 en los IV aviaries infectantes de bovinos (Uyeki et al., 2024). Se han detectado otras mutaciones en la polime-

12.- El ácido glutámico es sustituido por la lisina en la posición 627 de la PB2.

rasa de distintos clados de IV aviáres de bovinos, pero solo se ha demostrado actividad potenciadora de la polimerasa vírica, mediante la colaboración del cofactor ANP32, cuando existe la mutación PB2 M631L, en todos los mamíferos estudiados, hombre incluido (Fodor et al., 2024; Su et al., 2021); si bien se ha observado interacción de la polimerasa con la ANP32B, cuando existe la lisina en la posición 497 de la PA (Fodor et al., 2024). En el curso de la transmisión horizontal en el ganado vacuno se producen deslizamientos, adaptaciones en el complejo polimerasa vírica aviar, para adaptarse al nuevo huésped bovino.

Las proteínas accesorias del IV, PA-X y PB1-F2, pueden regular la inmunidad innata del huésped y la adaptación del influenzavirus aviar a los mamíferos (Park et al., 2020). PB1-F2 modula la apoptosis y la muerte celular (Chen et al., 2001), la respuesta inmune innata del huésped (Leymarie et al., 2013) y la actividad de la polimerasa viral (Mazur et al., 2008), influyendo en la patogénesis y facilitando infecciones bacterianas secundarias (Hu et al., 2020; Ma et al., 2019). Durante la replicación del virus, PB1-F2 desregula la señalización antivírica dependiente de RLR<sup>13</sup> al adherirse a la proteína de señalización antivírica mitocondrial (MAVS) e interferir con la expresión de IFN (Yoshizumi et al., 2014; Varga et al., 2012; Xiao et al., 2020).

## **RESPUESTA INMUNE/HOMEOSTASIA-MECANISMOS DE DEFENSA DEL INFLUENZAVIRUS**

Determinar cómo los virus escapan de la detección por parte del sistema inmune de las distintas especies, e incluso en diferentes individuos de la misma especie animal, permitiría controlar la propagación de los Influenzavirus, así como el desbordamiento epizootico y zoonótico.

### **RESPUESTA INMUNE INNATA**

Constituye la primera línea de defensa contra los influenzavirus. Comprende las barreras físicas: integridad de piel y mucosas; mucosidad y colectinas, distintas células fagocíticas, citoquinas, interferones y genes estimulados por interferones (Chen et al., 2018).

Tras el reconocimiento de los PAMPs (patrones moleculares asociados a patógenos) por parte de los PRRs (receptores de aquellos patrones), se desencadena la inmunidad antiviral del huésped, activándose diferentes cascadas de señalización, se liberan IFNs de tipo I, citoquinas y linfocinas pro-inflamatorias. Los IFN-I inducen la expresión de genes estimulados por interferón (ISGs), que traducen proteínas, que son las que en definitiva tratarán de controlar la infección, replicación e invasión tisular del Influenzavirus. Hasta aquí sería la respuesta primaria o innata, que se complementa con la adaptativa, la formación de anticuerpos y con la actividad celulolítica y citotóxica (en células infectadas por IVs y que exhiben en su superficie antígenos unidos a moléculas del MHC<sup>14</sup> de clase I) por parte de linfocitos T CD8+ (citotóxicos/citolíticos); e incluso puede desarrollarse una respuesta inmune célula-mediada dependiente de anticuerpos, al regular los componentes principales de estas vías de señalización (Davis et al., 2015).

13.- Receptores semejantes a RIG-I (eje RIG-I MDA5 LGP2).

14.- Complejo Mayor de Histocompatibilidad.

## ● RESPUESTA INMUNE ADAPTATIVA

La inmunidad adaptativa está mediada por linfocitos B y linfocitos T, caracterizados por células de memoria específicas de antígeno, que captan y neutralizan el patógeno (Chen et al., 2018).

### **Respuesta Inmune Celular:**

Los IVs infectan células epiteliales del aparato respiratorio, generalmente de la vías superiores, aunque virus de alta patogenicidad pueden invadir los pulmones. Tras la detección del IV por los PRRs, se produce un aflujo de células del sistema inmunocompetente a los lugares de infección: macrófagos residentes, macrófagos alveolares y células dendríticas (DC), las quimiocinas liberadas atraen células efectoras innatas circulantes, incluidos neutrófilos, monocitos y células NK (Iwasaki et Pillai, 2014; Chen et al., 2018).

Los receptores estimuladores de las células NK 2B4 y NTB-A se unen a la HA e incrementan la citotoxicidad de las células NK (Duvet-Cohen et al., 2016); pero las NA del IV eliminan los residuos de ácido siálico del receptor de citotoxicidad natural 1 (NCR1), con lo que las NK no pueden reconocer las HA del IV (Bar-On et al., 2013). Las NKs también se activan mediante la unión de su CD16<sup>15</sup> (FcγRIII) a la región Fc de los anticuerpos específicos contra la influenza e inicia la citotoxicidad celular mediada por anticuerpos (ADCC), contra células infectadas por el IV (Jegaskanda et al., 2013c, 14). La presencia de anticuerpos promotores de ADCC se correlaciona con la reducción de la gravedad de la enfermedad en los humanos y podría explicar la tendencia durante la pandemia de H1N1 de 2009, donde los individuos mayores, que tenían más probabilidades de tener anticuerpos de reacción cruzada en su suero, no estaban tan afectados como los individuos más jóvenes (Jegaskanda et al., 2013b; Valkenburg et al., 2019). Según Vandervan et al (2016) los humanos producen anticuerpos contra las proteínas internas del IV, con los que activan las células NK. En animales mamíferos de larga vida, las sucesivas infecciones por IVs podrían inducir anticuerpos que promoverían ADCC, reduciendo así, o eliminando la enfermedad clínica. Las NKs también pueden ser activadas a partir del reconocimiento del ARN del IV por el TLR7, en bazo y pulmón (Stegemann-Koniszewski et al., 2018).

Las células NK de memoria se localizan en el hígado merced a la expresión del receptor de quimiocinas CXCR6 y median las respuestas protectoras contra la infección secundaria por influenza en ratones (Paust et al., 2010; Li et al., 2017). Para Dou et al (2015) existen evidencias de que la vacunación contra la influenza en ratones promueve el desarrollo de células NK de memoria que secretan rápidamente grandes cantidades de IFN-γ tras la infección artificial.

Células NK<sup>16</sup> activadas con α-galactosilceramida mejoran la respuesta inmune innata temprana sin afectar la inmunidad de las células T y reducen la carga de IVs en los pulmones de los ratones infectados experimentalmente (Ho et al., 2008), incrementan la respuesta de LT CD8+ frente a la infección por IV A (Khan et Khan, 2021). Su actividad se debe a la producción de grandes cantidades de IFN-γ, la activación de células NK y la amplificación de la producción de IL-12 por las células dendríticas (van Dommelen et Dogli-Esposti, 2004); además la activación de las células iNKT se corresponde con un aumento rápido, pero transitorio, en las citocinas quimioattractivas. Esta regulación de quimiocinas proinflamatorias, reduce la probabilidad de que se produzca una tormenta de citoquinas.

15.- Componente del receptor de baja afinidad para Fc, FcγRIII, media en la fagocitosis y citotoxicidad celular dependientes de anticuerpos.

16.- Son Células NK con receptor TCR, cuya cadena de inmunoglobulina α es invariante.

De hecho, las citoquinas IL-12 e IFN- $\gamma$  y las quimioquinas MCP-1<sup>17</sup> y MIP-2<sup>18</sup> inducen infiltración de neutrófilos y el incremento de monocitos en el lugar de infección (White et al., 2007; Fujisawa et al., 1987, 2001; Tecle et al., 2007). Si bien donde más importancia adquiere la infiltración neutrofílica es en las sobreinfecciones bacterianas, los neutrófilos fagocitan las células epiteliales pulmonares apoptóticas infectadas por IV A, a partir de la activación de TLR4, conjuntamente con anticuerpos, aunque transitoriamente (Hashimoto et al., 2007; Fujisawa, 2008), debido a la producción de IL4 (Ho et al., 2008). Las iNKT parecen modular la liberación de TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  y NO en la infección (Duthie et al., 2005), así como disminuir la infiltración neutrofílica pulmonar (Michel et al., 2007), lo que disminuye la probabilidad de que se origine una neumonía difusa debida al infiltrado neutrofílico.

La ADCC es una defensa inmunitaria mediada por células en la que los anticuerpos específicos que se unen a los antígenos de la superficie de la membrana de las células diana también interactúan con los receptores Fc de las células efectoras (las células Natural Killer (NK)) y provocan la lisis de la célula diana. Los anticuerpos ADCC suelen dirigirse contra proteínas internas del virus como M1 y NP y son comunes tanto en adultos sanos como infectados. Por lo tanto, estos anticuerpos podrían ofrecer una protección reactiva cruzada (Sayedahmed et al., 2024; Li et al., 2021; Caddy et al., 2020; Vandervén et al., 2016). La ADCC podría ser el principal mecanismo en el que actúan los anticuerpos contra epítomos conservados (pero subdominantes) y contribuir a la puesta a punto de una vacuna universal contra la influenza.

Los linfocitos T CD4<sup>+</sup> reconocen por su TCR células infectadas por IV, merced a la presentación de antígenos en la superficie de aquellas, procesados en el contexto de moléculas MHC II. Los clones de células T se activan tras la presentación de antígenos, por parte de las APC (células presentadoras de antígenos), células dendríticas principalmente (DC) y proliferan en los ganglios linfáticos antes de convertirse en células efectoras funcionales (Lawrence et Braciale, 2004). Posteriormente las células T regresan al lugar de infección, ya efectoras, entran en contacto con células infectadas (Roman et al., 2002; Legge et Braciale, 2003).

Las células T reconocen una variedad de proteínas externas e internas del IV, cuyos antígenos son expresados en la superficie de las células infectadas unidas a moléculas del MHC I. La proteína 1 de matriz (M1) y la nucleoproteína intracelular (NP), que es la principal activadora de LT CD8<sup>+</sup> (citotóxicos), son determinantes en la inmunidad mediada por LT contra la influenza y son las responsables de la inmunidad cruzada entre cepas de IVs. La presencia de células T CD8<sup>+</sup> memoria de reacción cruzada en pulmón, productoras de IFN- $\gamma$  e IL-2 suele corresponder a un proceso menos grave (Sridhar et al., 2013). Los clones de células T específicos para HA o NA solo son efectivos frente a la cepa específica que los activó (Townsend et al., 1984; Braciale, 1977). No obstante se han detectado reacciones inmunitarias cruzadas debidas a linfocitos T entre virus de influenza distintos: pH1N1, H5N1 y H7N9 y se correlacionan con la disminución de morbilidad y mortalidad (McMaster et al., 2015; Sridhar et al., 2013; Guo et al., 2011; Lee et al., 2008), lo cual es de gran importancia epizootiológica/epidemiológica. Esta inmunidad cruzada es debida al reagrupamiento vírico, que contienen proteínas pertenecientes a los virus originarios del reagrupamiento y que en su momento indujeron la respuesta celular inmune a aquellas. Los linfocitos T CD8<sup>+</sup> son los principales efectores de la inmunidad cruzada frente a algunos virus de la influenza, sobre todo los que comparten identidad en las proteínas NP y M1; sin embargo la respuesta protectora precisa de linfoquinas producidas por linfocitos TH (CD4<sup>+</sup> -TH1 productores de IFN- $\gamma$  e IL-2; TH2 productores de IL4- y Tctx (CD8<sup>+</sup>, citotóxicos), así como de quimiocinas y citocinas e interleucinas (IL10 supresora e IL12 proinflamatoria) producidas por macrófagos residentes, células dendríticas (DC), etc.

17.- Proteína quimioatrayente de monocitos.

18.- Proteínas inflamatorias producidas por macrófagos.

## **Respuesta Inmune Adaptativa Humoral**

Los linfocitos B, se transforman en células plasmáticas que producen anticuerpos. La principal respuesta inmunitaria humoral es debida a anticuerpos circulantes específicos contra la hemaglutinina. Además, los anticuerpos pueden unirse a la superficie de las células infectadas e inducir citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos o activación del complemento (Chen et al., 2018).

Los dos principales antígenos, tanto para la identificación del IV, para su clasificación como para la inducción de anticuerpos, son la Hemaglutinina (HA) y la Neuraminidasa (NA), de la superficie de la partícula vírica.

### **Generación de Anticuerpos (Guthmiller et al., 2021)**

Tras la primera exposición a un influenzavirus las células B naïve (inactivas) capaces de reconocer antígenos víricos, se activan y se convierten en plasmoblastos extrafoliculares, o bien en linfocitos B de centros germinativos. La mayoría de los linfocitos B naïve específicos de antígenos proteicos se activan de forma T-dependiente, requiriendo de linfocitos TH CD4<sup>+</sup> (Th2, que producen IL4) para diferenciarse en plasmoblastos (PBs) o linfocitos B de centros germinativos (GC B) (Vohr, 2005). Estos plasmoblastos generan durante un corto período de tiempo IgM de baja afinidad, aunque de alta avidez por antígenos de IV (Blanchard-Rohner et al., 2009) y constituyen un primer aporte de anticuerpos protectores, en tanto se producen la maduración por afinidad y la selección clonal en los centros germinales (Guthmiller et al., 2021).

Los anticuerpos aparecen entre 7 y 14 días post-infección o post-vacunación, dependiendo de la especie animal, de la edad del individuo, de la cepa de IV y de la carga infectante, así como del estado de salud y compromiso inmunitario del animal. En primer lugar se forman los centros germinativos, los clones de células B (que también son presentadoras de antígenos) proliferan en ellos, en su zona oscura, mutan sus genes de anticuerpos del BCR<sup>19</sup> en los lugares de unión al antígeno, con lo que incrementan la afinidad por su epítipo específico (Mayer et al., 2017; Stewart et al., 2018). Tras ello las células B se localizan en la zona de luz, donde tratan de internalizar los antígenos presentados por células dendríticas foliculares, compitiendo entre ellas. Los clones de células B que han capturado e internalizado el antígeno presentan péptidos de antígeno, unidos a moléculas de MHC de clase II, a linfocitos T helper foliculares (Tfh) que poseen la misma especificidad de antígeno (Shulman et al., 2014). Los Linfocitos B de centros germinales experimentan sucesivas proliferaciones mediante el factor Myc<sup>20</sup> (Gitlin et al., 2014; Finkin et al., 2019). Las células B que no capturan antígeno y lo presentan a las células Tfh, sufren apoptosis (Liu et al., 1989). Los LB de centros germinales que han interactuado con Tfh vuelven a la zona oscura para madurar, o alternativamente diferenciarse en Células Plasmáticas de larga duración (LLPC); las que tienen menor afinidad pueden convertirse en Células B memoria (MBC) (Wong et al., 2020; Guthmiller et al., 2021). Las MBCs específicas de hemaglutinina tienen una afinidad muy variable, hasta indetectables (McCarthy et al., 2018; Mesin et al., 2019); sin embargo los PB (plasmoblastos) derivados de células B memoria (MBC) tienen una alta afinidad (Wrammert et al., 2008, 11). El primer contacto con IVs, bien por infección natural, bien por Inmunización Activa determinará el tipo de células B formadas, especialmente células B de larga duración (que en animales domésticos o de compañía de larga vida, podrían serles útiles frente a IVs

19.- Receptor Clonotípico de células B.

20.- Las proteínas Myc son factores de transcripción implicados en el control de la progresión del ciclo celular, la apoptosis y la transformación celular.

durante toda su vida) y con ellas la fortaleza de la respuesta inmune humoral, ya que los IVs A mutan muchísimo, bien por deslizamiento de sus glicoproteínas de superficie, bien por reagrupamiento de diferentes virus infectantes de un individuo, la inmunidad conferida, solo valdrá contra posteriores exposiciones al IV del primer contacto o a cepas estrechamente relacionadas (esta inmunidad cruzada es especialmente importante frente a proteínas internas del IV que pueden estar presentes en IVs originados por reagrupamiento; si bien los antígenos de las proteínas internas del virus generalmente son controlados por la inmunidad celular -LT, NKT, Nk-).

La ruta de exposición al IV también es importante a la hora de determinar que especificidades de las células B se activen y se diferencien en subconjuntos de LBs de larga duración

### ***Activación de MBC y células B ingenuas tras exposiciones repetidas a IAV***

Los animales se defienden de los IVs infectantes activando las células B memoria correspondientes al primer contacto que tuvieron con IVs, a edad temprana, por lo general. Los CMB seleccionados se dirigen a epítomos compartidos de exposiciones anteriores, que incluyen epítomos conservados y variables, y se convierten en plasmoblastos, o bien vuelven a introducirse en Centros Germinales para madurar y adquirir mayor afinidad contra la cepa infectante (Mesin et al., 2019; Turner et al., 2020; Dugan et al., 2020). Tanto unos como otros incrementan su afinidad; los que no tienen afinidad no participan en la respuesta secundaria, pero pueden volver a convertirse en MBCs (Viant et al., 2020). Otras células B inmaduras pueden ir a centros germinales secundarios y generar una nueva respuesta humoral, hecho que constituye una respuesta policlonal, que diversifica la respuesta de anticuerpos contra epítomos compartidos por distintos antígenos de IVs (Mesin et al., 2019; Turner et al., 2020); y a la vez se generan células plasmáticas de larga duración (LLPC) y células B memoria (MBC), en estos centros germinales secundarios. Las MBCs activadas en los centros germinales tienen actividad cruzada frente a anteriores IVs que hayan infectado al individuo, mientras que las LBs naïve son específicos de la cepa infectante de novo (Turner et al., 2020), con lo que se generan nuevos plasmoblastos y MBCs contra nuevos antígenos (de los nuevos influenzavirus que han infectado al animal). Tras una nueva infección los MBCs son reactivados; si proceden de cepas vacunales se recuperan los correspondientes a anticuerpos contra la hemaglutinina (HA) (Guthmiller et al., 2020; Henry et al., 2019), mientras que si han sido generados como consecuencia de infecciones anteriores suelen corresponder a Neuraminidasa (NA) y Nucleoproteína (NP) (Chen et al., 2018; Dugan et al., 2020). Los MBCs capaces de reaccionar contra la nueva cepa infectante son reactivados, independientemente de su mayor o menor afinidad antigénica.

En dependencia de la distancia antigénica (variación antigénica) existente entre el IV infectante y los IVs que generaron anteriormente inmunidad en el individuo, el sistema inmune recuperará preferentemente los MBCs ampliamente reactivos. Si el individuo ha sido infectado por la misma cepa que originó la respuesta inmune anterior, o una cepa muy parecida, se activarán MBCs contra epítomos variables de la cabeza de la HA (Dugan et al., 2020; Andrews et al., 2015; Guthmiller et al., 2020, 21), ya que la distancia antigénica entre los virus es pequeña. La vacunación y la infección con virus antigénicamente distantes pueden conducir a la activación de MBCs con un amplio rango de neutralización vírica, que podría proporcionar protección contra IAV antigénicamente distintos dentro del mismo grupo HA (Fonville et al., 2014).

No obstante, en el caso de influenzavirus aviáres en mamíferos, la recuperación de los MBCs puede incrementar los anticuerpos contra los epítomos protectores conservados dentro de los grupos IVs aviáres, pero la activación preferencial de los MBC contra el subtipo de IV aviar que originó la primera respuesta puede dejar a individuos susceptibles a infecciones por IVs aviáres antigénicamente distantes, siendo más susceptibles a la infección con un IV aviar diferente (Gostic et al., 2016, 19).

La activación preferencial de los MBC de reacción cruzada, procedentes de exposiciones durante las primeras edades de los animales también puede afectar negativamente a la inmunidad humoral contra una variante derivada del mismo subtipo, ya que los anticuerpos neutralizantes de alta afinidad contra la cepa originaria de aquellos MBCs pueden tener una baja afinidad y no neutralizar la nueva cepa (Linderman et al., 2016). También la reactivación de los CMBs puede permitir el reingreso de los linfocitos B de baja afinidad en los GC para madurar e incrementar su afinidad contra la variante vírica derivada. En particular, los anticuerpos contra RBS muestran fuertes características correpondientes a la primera activación inmune, con lo que generalmente neutralizan potentemente las cepas mas relacionadas con la que originó la memoria inmune, pero no las cepas contemporáneas (Ekiert et al., 2012). Los clones de LB frente a RBS (dominio de unión a receptor del IV), incrementan la afinidad con sucesivas infecciones, reentrando en los centros germinales (McCarthy et al., 2018, 19; Guthmiller et al., 2021), lo que permite el incremento de la diversificación de LBs frente a IV, e incluso IVs aviares, si bien es cierto que en animales mayores, especialmente en humanos, se activan las MBCs dirigidas a antígenos conservados (correspondientes al primer contacto con IVs) (Ju et al., 2018), como los NP, pero rara vez inducen anticuerpos neutralizantes contra HA (Henry et al., 2019), por lo que es más difícil que los animales muy mayores generen anticuerpos neutralizantes frente a nuevos IVs que los jóvenes (Sasaki et al., 2011). Esto puede ser debido a que los MBCs de ratones y humanos viejos presentan menor tasa de mutación, ya que tienen disminuida la presencia de citidina deaminasa (Frasca et al., 2004, 08), con lo que se dificulta su activación; además de que presentan mayor dificultad para reentrar en los centros germinales (Goenka et al., 2014) y entrar en contacto con LTfh (Hill et al., 2021), lo que dificulta que los LB puedan responder adecuadamente a nuevas cepas de IV y a los IVs vacunales (Carr et al., 2021).

## ***Factores que limitan la inmunidad humoral robusta y la inducción de bnAbs***

### ***Competencia por Antígenos, ayuda con células T***

Los LB seleccionados por su especificidad como de larga duración, dependen de su capacidad para competir con otros clones de LBs por los antígenos. Los clones de células B dirigidos al mismo antígeno, como HA, pero a epítomos distintos, compiten por el mismo antígeno (HA), en el centro germinal, con clones de células B de mayor afinidad seleccionados preferentemente de entre los grupos de LLPC. Además, los MBC con apreciable afinidad tienen más probabilidades de incrementar su afinidad en los GC secundarios, mientras que los MBC de baja afinidad no vuelven a entrar en los GC secundarios y pueden rediferenciarse rápidamente en MBC (Viant et al., 2020). Los PB específicos para una cepa, lógicamente poseen una afinidad más alta para la cepa de IV inductora, mientras que los PB contra los epítomos conservados, de anteriores contactos con otros IVs, tienen mayor afinidad por las cepas anteriores que las indujeron (Dugan et al., 2020). Así los MBCs reactivados contra epítomos conservados tienen menor afinidad en los GC que los MBC específicos de los nuevos IVs.

Hay epítomos de HA de difícil acceso, por los que los LBs tienen dificultad para contactar con ellos y activarse; especialmente les resulta complicado para los que están en la región del tallo de la HA, ya que aquel se sitúa dentro de la membrana vírica y los viriones poseen gran cantidad de glicoproteínas en su superficie (Vasilewski et al, 2012; Gallagher et al., 2018). Además, el RBS de la cabeza de HA es un epítomo excepcionalmente pequeño y la mayoría de los anticuerpos utilizan solo la tercera región determinante de la complementariedad de su cadena pesada para unirse a los residuos conservados del RBS (Ekiert et al., 2012; Schmidt et al., 2015), con lo que los LBs dirigidos a estos epítomos tendrán menos avidez o tendrán la avidez correspondiente a una combinación de

las afinidades de múltiples sitios de unión a anticuerpos. Si un epítipo es de difícil acceso, es poco probable que los sitios de unión de un BCR puedan unirse al antígeno o que múltiples BCR de una célula B puedan unirse al antígeno, en un proceso conocido como agrupación de BCR. En ausencia de la agrupación de BCR, las células B son menos eficientes para internalizar el antígeno que se puede presentar a las células T CD4 (Kim et al., 2006; Katkere et al., 2012). Lógicamente los LB con mayor avidez son inmunodominantes y las células B que se dirigen a epítipos difíciles de alcanzar tendrán menos probabilidades de activarse y diferenciarse en PB o entrar en GC (Guthmiller et al., 2021).

Como Los LB necesitan para su activación de los LTH, son los de mayor afinidad las que consiguen presentar el antígeno a los linfocitos helper CD4; estos antígenos son principalmente las NP y M1, en vez de las glicoproteínas de superficie HA y NA (Richards et al., 2018), aunque los LTfh suelen especializarse en la HA (Leddin et al., 2015).

### **Neutralización por anticuerpos**

Las células plasmáticas generadas por LBs producen, tras el contacto con IVs anticuerpos IgA, IgM e IgG (Price et al., 2020). Los LBs también pueden producir Inmunoglobulinas (anticuerpos), que quedan unidos a su superficie, tras la captación de antígenos, y que les sirven, entre otras funciones para interactuar con células NK. Las células Plasmáticas secretoras de IgA poseen genes para receptores de quimiocinas CCL25, 27 y 28, así como la integrina beta 7 abundantes en mucosa digestiva y respiratoria, por lo que la IgA se asocia con la defensa mucosa frente a la influenza (Kunkel et al., 2000; Wurbel et al., 2000); las madres porcinas transfieren a sus lechones IgA mediante calostro y leche. En tanto que las células plasmáticas secretoras de IgG e IgM expresan niveles significativos de Cxcr4 (receptor de CXCL12). El CXCL12 prevalece en médula ósea y células plasmáticas de larga vida (Hargreaves et al., 2001; Nie et al., 2004; [https://www.3tres3.com/articulos/el-sistema-inmunitario-y-la-inmunidad-en-el-cerdo-inmunidad-de-mucosa\\_38827/](https://www.3tres3.com/articulos/el-sistema-inmunitario-y-la-inmunidad-en-el-cerdo-inmunidad-de-mucosa_38827/)). En cerdo se detectan IgM e IgG anti HA (de A/swH1N1) a los tres días post-infección experimental; la IgA en la mucosa nasal apareció un día después (Lee et al., 1995).

En referencia a la influenza aviar existen tres isotipos de anticuerpos en aves: una molécula de alto peso, IgM; dos subclases (7-8) del tipo IgG que constituyen la mayor cantidad de inmunoglobulinas en el plasma; y una del tipo IgA que se encuentra en las secreciones externas como la vesícula biliar y el oviducto (Lebacqz-Verheyden et al 1972). Las gallinas producen una molécula de Inmunoglobulina, IgY, que es funcionalmente equivalente a la IgG de los mamíferos (Warr et al., 1995). Las IgY se encuentran en el suero de los pollos y se transmiten de las gallinas al embrión a través de la yema del huevo, transmitiendo una alta concentración de IgY de gallina al embrión en desarrollo (Carlander et al., 1999; Nguyen et al., 2010).

Los anticuerpos neutralizantes más potentes reconocen el RBS en HA.

**Repertorios de células B restringidas y polireactividad/autoractividad de bnAbs:** Los bnABS son anticuerpos ampliamente neutralizantes contra la HA del IV. Los anticuerpos de unión a RBS, con H-CDR3 largos (el RBS de la cabeza de la HA es un epítipo excepcionalmente pequeño, y la mayoría de los anticuerpos sólo utilizan la región 3 (CDR3) determinante de la complementariedad de la cadena pesada para unirse a los residuos conservados del RBS), imitan la unión a ácidos siálicos (Ekiert et al., 2012), por lo que los dominios de cabeza y tallo se unen a LB específicas para ellos.

Los anticuerpos dirigidos a epítipos conservados de HA a menudo son polireactivos<sup>21</sup> (Andrews et al., 2015; Guthmiller et al., 2020). Estos anticuerpos pueden neutralizar un más diverso número de IVs distintos; pero pueden originar autorreactividad (Bojic et al, 2019; Guthmiller et al., 2020). Ade-

21.- Tienen capacidad para unirse a múltiples antígenos molecularmente distintos.

más, la polireactividad es inherente a las células B ingenuas que se dirigen a epítomos conservados, que se seleccionan preferentemente en el grupo de MBC frente a los epítomos ampliamente neutralizantes (Guthmiller et al., 2020). Como la polirreactividad y la autorreactividad son los principales contribuyentes a la eliminación clonal (Wardemann et al., 2003), el repertorio de células B naíves contra los epítomos conservados de HA puede reducirse aún más.

## ■ FISIOPATOLOGÍA

La infección por IVs se produce por vía oral/digestiva principalmente en aves y por vía respiratoria en mamíferos fundamentalmente, aunque ambas vías pueden ser productivas en ambas Clases zoológicas.

La patogénesis de la infección por el virus de la gripe se debe principalmente al aumento de la replicación vírica y/o a la inhibición de las vías antivíricas celulares y humorales, siendo la perturbación del sistema de ubiquitina celular el mecanismo más común y conocido.

En la vía respiratoria las células epiteliales producen mucinas, que contribuyen a la restricción de la infección por IVs (Roy et al., 2014). Estas glicoproteínas son ricas en ácidos siálicos, que pueden actuar como receptores de influenzavirus, que quedan retenidos por ellas, evitando que infecten las células epiteliales (Mcauley et al., 2017). Sin embargo la neuraminidasa puede inhibir esa acción retenedora (Cohen et al., 2013). Yang et al. (2016) observan que la mutación D151G en la NA permite la unión de A/H3N2 aviar (que tiene avidez por el receptor  $\alpha$ 2-3) al receptor mamífero  $\alpha$ 2-6 de ácido siálico. Pero esta mutación disminuye la actividad enzimática de la NA, necesaria para desprender la HA de sus receptores (Yang et al., 2016; Gulati et al., 2013).

Células NK, NKT (células asesinas naturales con TCR  $\alpha$ , $\beta$  de linfocitos) y linfocitos T son esenciales en las respuestas del huésped a la infección por influenza. Las NK y NKT actúan tanto en la inmunidad innata como en la respuesta adaptativa y conectan y modulan ambas respuestas. Producen citocinas inmunomoduladoras y median la respuesta citotóxica a la infección. Un desequilibrio en las respuestas de las células NK y T puede producir inflamación pulmonar con daño tisular, lo que conllevaría a una infección incontrolada por el sistema inmune. La mayor letalidad debida a la influenza se debe al descontrol de la inflamación, consecuencia de una tormenta de citoquinas (Frank et Paust, 2020). Las células NK y las células T contribuyen a la tormenta de citoquinas, pero también son necesarias para la eliminación viral.

Los IV A de alta patogenicidad, como los H5N1 y H1N1 inducen en sus huéspedes la producción de elevadas cantidades de factores proinflamatorios, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  IL-6, IL8, IL12, IL17, IL18, MCP-1 e IP-10<sup>22</sup>, llegando a inducir una tormenta de citoquinas (Wang et al., 2010; Cheng et al., 2011) y que son las responsables últimas de las muertes originadas por cepas altamente patógenas de IV como A/H5N1 (Jong et al. 2007). Para no perjudicar la vida del huésped se necesita una homeostasia, que module la inmunidad antiinfluenzavirus; el organismo animal recurre a la epigenética. A la activación de los distintos factores de transcripción se corresponde un mecanismo de regulación (Smale, 2012); de modo que se establece un continuo activación transcripcional-inhibición transcripcional. La iniciación de la transcripción, a nivel nuclear, depende de la estructura de la cromatina: la transcripción

22.- Quimiocina proteína 10 inducida por INF (IP-10 o CXCL10) es secretada por macrófagos, monocitos y células endoteliales en respuesta al INF.

de los genes promotores de inmunidad *ifit2*, *ifit3*<sup>23</sup> y *mx* requieren una remodelación del nucleosoma mediante SWI/SNF<sup>24</sup> y la modificación de histonas H3K4M3<sup>25</sup> ó H3K9/K14ac<sup>26</sup> (Ramírez-Carrozzi et al., 2009). Así el promotor del IFN- $\gamma$  está regulado por el lncRNA<sup>27</sup> NeST (denominado así por eliminar la Salmonella pero no el virus de Theiler en el ratón), que se une al componente del complejo metilasa H3K4 WDR5 para alterar los niveles de metilación de histonas (Gómez et al., 2013).

Durante la infección por IV A, éste puede alterar el metabolismo de la célula huésped, transformando el entorno celular para facilitar su replicación, provocando apoptosis. El ARN de interferencia (ARNi) es un mecanismo antivírico en animales (Fire, 2005). Como mecanismo específico de silenciamiento génico, el ARNi induce la degradación eficiente y específica del ARNm homólogo a través del ARN de doble cadena, lo que conduce al silenciamiento de genes diana específicos e inhibe su expresión a nivel postranscripcional y traslacional (Lares et al., 2010). En cuanto a los virus, el dsRNA IV A (en determinados momentos el RNA del IV posee cadena doble) y el IV A puede ser reconocido por la ARNasa III, que pertenece a la familia de enzimas Dicer, y lo escinde en pequeños fragmentos de ARN de interferencia (siRNA) para formar un complejo funcional de silenciamiento inducido por ARN (RISC). Este ARN de segmento pequeño de doble cadena, (ARNsi), también puede sintetizarse in vitro; consta de ARN de sentido positivo y antisentido que pueden transfectarse en células para formar el RISC. El RISC se combina específicamente con el ARN complementario del virus, degrada el ARNm homólogo y silencia los genes correspondientes (Tijsterman y Plasterk, 2004). Este silenciamiento génico postranscripcional (SGPT) se denomina ARNi. Y como puede sintetizarse in vitro (Huo et al., 2018) puede utilizarse como terapéutica.

## ● ACTIVACIÓN DE VÍAS DE SEÑALIZACIÓN:

La respuesta inmune comienza con el reconocimiento del virus por parte de los receptores de reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos (PRRs), en el caso de los Influenzavirus el TLR3 y el eje RIG-I/MDA5/LGP2<sup>28</sup> son los principales receptores de reconocimiento de patógenos implicados en su detección. RIG-I es un sensor de ARN extraño, que identifica ARN vírico de doble cadena (dsRNA). Está especialmente activado durante la infección por IV A (Yoneyama et al., 2004, 8). Se trata de una helicasa ARN con dos dominios de activación y reclutamiento de caspasa N-terminal (CARD), un dominio principal de helicasa y un dominio C-terminal (CTD) (Jiang et Chen, 2011).

23.- Son genes inducidos por IFN, transcritos al comienzo de la infección vírica. IFIT1/5, proteínas inducidas por IFN con 1-5 5 repeticiones tetratricopeptídicas; IFITM, proteína transmembrana inducida por interferón, bloquea la etapa temprana de la infección vírica; OASL (2'-5'-oligoadenilato sintetasa) actúa como sensibilizador de RIG-I, uniéndose al dominio de activación y reclutamiento de caspasa y mejorando la producción de interferón; MxA, (proteína de resistencia al mixovirus) eleva su presencia en la fase aguda de la infección.

24.- *SWItch/Sucrose Non Fermentable* es un complejo proteico remodelador del empaquetamiento del ADN en los nucleosomas, en células eucariotas.

25.- H3K4me3 es una modificación epigenética de la proteína de empaquetamiento del ADN Histona H3 que indica la trimetilación en el 4º residuo de lisina de la proteína histona H3 y que a menudo está implicada en la regulación de la expresión génica. El nombre denota la adición de tres grupos metilo (trimetilación) a la lisina 4 de la proteína histona H3.

26.- Histona 3 (H3) acetilada en K9 -lisina- y en K14.

27.- Segmento Largo no codificante de ARN.

28.- La familia de RLRs consiste en tres proteínas, RIG-I, MDA5 y LGP2. RIG-I y MDA5 detectan dsARNs virales y activan una cascada de señalización para la producción de interferones (INF) como respuesta antiviral. Sin embargo, aunque tienen muchas similitudes, LGP2 no actúa igual, sino que se piensa actualmente que podría ser un regulador negativo de RIG-I y MDA5; LGP2, no tiene la habilidad de inducir la señalización por si solo debido a la ausencia de los dominios CARD, pero se ha visto que es necesario para una respuesta antiviral efectiva mediada por RIG-I y MDA5.

Estos dominios necesitan unirse al ARN y a la Proteína de Señalización Mitocondrial (MAVS) como adaptadores descendentes (Davis et Gack, 2015). RIG-I sufre una modificación post-traducciona (PTM) por ubiquitinación, una vez que está unido al dsARN mediante su dominio CARD, es poliubiquitinado en K63 por la lisina 172 de TRIM25 (Gack et al., 2007; Okamoto et al., 2017). RIG-I también es ubiquitinado por la ligasa E3 Riplet<sup>29</sup> (Oshiumi et al., 2009,10; Gao et L., 2009). (PB1 primero se une al extremo 5' del ARN vírico (ARNv), activando PB2 y haciendo que el extremo 3' del ARNv forme una zona de doble cadena con el extremo 5'). La estimulación de estos origina una cascada de señalización/fosforilización que concluye en la activación de los factores de transcripción IRF3/7<sup>30</sup> y NF-κB<sup>31</sup>; como consecuencia se producen inmediatamente IFN de tipo I y III, se inducen ISGs los que a su vez originan la síntesis de grandes cantidades de proteínas antivíricas. La acumulación de ISGs en el citosol, incluidas las IFIT2 e IFITM3 (Everitt et al., 2012) y la proteína MX<sup>32</sup> (Mänz et al., 2013), provee resistencia antivírica. Las proteínas IFIT-2 y 3 de humanos y la IFIT5 de aves muestran propiedades antivíricas mediante el secuestro del ARNv por unión al 5'-trifosfato (Husein 2024). IFIT en el pato secuestra las NPs víricas (Rong et al., 2018). La interacción entre el RIG-I ubiquitinado y los MAVS induce la producción de IFN tipo I, concretamente el IFN-β (Yoneyama et al., 2004). La oligoadenilato sintetasa (OAS), que corresponde también a los genes inducidos por IFN, detecta el ARN vírico y convierte el ATP en 2,5-oligoadenilato, el cual activa a la ribonucleasa L, que degrada el ARNv, con lo que restringe la infección (Li et al., 2016).

Otra actividad antivírica depende de la interacción entre las proteínas del IV NS1 y NP y la helicasa DDX3 del animal infectado, que ejerce actividad antivírica mediante la regulación de la formación de gránulos de estrés<sup>33</sup> (Thulasi Ramal et al., 2016).

A diferencia de los órdenes Charadriiformes y Anseriformes, el orden Galliformes, como gallinas, pavos y otras aves de corral son muy susceptibles a la Influenza clínica, en las que origina altas tasas de morbi-mortalidad. Una de las razones ser podría ser la ausencia de determinados receptores (PRRs) y con ellos déficits en las vías de señalización y en definitiva falta de moléculas de acción antivíricas.

En el caso de gallinas (*Gallus gallus*), pavos (*Meleagris gallopavo*) no se ha demostrado la existencia del gen ortólogo del *ddx58* (humano) que codifica para el sensor de ARN de doble cadena RIG-I; también se ha observado la falta de algunos receptores TLR, incluso algunas citoquinas (Maggior et al., 2013). En anseriformes, en patos (*Anas acuta*) concretamente, sí se ha detectado la proteína RIG-I funcional (Barber et al., 2010). No obstante las galliformes sí poseen el MDA5, del eje RIG-I/MDA5/LGP2 (Liniger et al., 2012).

29.- RING finger protein leading to RIG-I activation.

30.- Factores reguladores del interferón que se expresa constitutivamente y experimenta una modificación posttransducciona tras la infección vírica, se fosforiliza y se transloca al núcleo, se une al ADN y activa la transcripción de genes para interferones tipo I.

31.- Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas. Es un complejo proteico que controla la transcripción del ADN.

32.- Las proteínas de resistencia a los mixovirus (Mx) son grandes GTPasas evolutivamente conservadas similares a las dinaminas que intervienen en la resistencia viral desencadenada por los IFN de tipo I y III [144]. La MxA humana es una proteína citoplasmática que confiere resistencia a un gran número de virus como el VSV y el IAV.

33.- Gránulos citoplasmáticos compuestos de ribonucleoproteínas que se forman solo cuando las vías activadas por estrés detienen el inicio de la traducción. Los gránulos de estrés y los cuerpos de procesamiento secuestran mRNP (mARN unido a proteína) inactivos. Los gránulos de estrés eliminan los mRNP a través de la autofagia y pueden interactuar con los Cuerpos-P (en ellos los ARNm de la maquinaria de traducción estancada se desadenilan y se condensan para su secuestro).

## Activación del Sistema Inmune del Animal infectado

Génica y epigenéticamente los genes que traducen proteínas víricas y del huésped son modulados por segmentos largos no codificantes de ARN y por mecanismos epigenéticos que actúan sobre la cromatina. Proteómicamente, las proteínas del Huésped y del virus influenza son modificadas mediante procesos de ubiquitinación, tendentes a favorecer la respuesta del sistema inmune del animal y la propagación del virus. Es decir, del balance entre virulencia (entendida como replicación y expansión tisular del IV) y respuesta inmunitaria, depende la aparición de enfermedad.

La maduración y estabilización del ARNm son críticos en la regulación postranscripcional. Las ribonucleoproteínas nucleares heterogéneas (hnRNPs) regulan la transcripción de genes y la posterior modificación del ARN recién sintetizado en el núcleo: las hnRNP L y A/B se asocian con la inducción de los genes inmunitarios para  $\alpha$ -TFN y CCL5<sup>34</sup>, mediante la interacción con el lncRNA (segmento largo de ARN no codificante) THRIL (TNF y HNRNPL -ARN no codificante largo inmunorregulador-) y el lincRNA-Cox2 (regula la respuesta inflamatoria inducida por TLRs) respectivamente (Carpenter et al., 2013; Li et al., 2014); lo que implica la actuación de correguladores en la homeostasia entre los genes correspondientes a la inmunidad innata (activación/inhibición). El muy importante factor de transcripción NF- $\kappa$ B en la inmunidad innata, está regulado por distintos miRNA<sup>35</sup>; el TRAF6<sup>36</sup> es regulado a la baja por un micro ARN de interferencia, el miR-146a, que está sobreexpresado en células NK y LT (Moghoofei et al 2018; Iwasaki et al., 2014), en las infecciones por influenzavirus H1N1 y H3N2. Se ha determinado que el miR-146a<sup>37</sup> se encuentra sobreexpresado en infecciones por H1N1 y H3N2 (Buggele et al., 2012; Terrier et al., 2013); sin embargo la inhibición de miR-146a resulta en un significativo incremento de la carga vírica y difusión orgánica de H1N1 y H3N2 (Ma et al., 2016). La infección vírica induce la transcripción de miRNA-146a, que suprime la expresión de TRAF6 y la activación de NF- $\kappa$ B; pero también disminuye la replicación del influenzavirus (Ma et al., 2016). Otro segmento microinterferente de ARN, miR-302c impide la traslocación al núcleo de NF- $\kappa$ B, porque su mecanismo de interferencia dificulta la expresión de la quinasa inductora de NF- $\kappa$ B (Gui et al., 2015). Tras la infección por influenzavirus se produce una disminución de miR-302c, lo que acarrea un incremento de la expresión de IFN tipo I y de NF- $\kappa$ B, lo que origina disminución de la replicación vírica (Ma et al., 2016). Además se produce inhibición de la transcripción de los vtRNAs<sup>38</sup> (Ma et al., 2016; Aghajani, 2023) por contra, una expresión forzada de aquellos incrementa la propagación vírica (Li et al., 2015), debido a que los vtRNAs impiden la expresión de la proteína quinasa R (PKR), por la proteína NS1 de influenzavirus y la respuesta del IFN tipo I, ambos importantes componentes de la respuesta inmune innata (Kunkeav et al., 2013; Lee et al., 2014; Li et al 2015; Ma et al., 2016). También es importante el papel desarrollado por la GBP1<sup>39</sup> que inhibe la replicación temprana del

34.- Quimiocina de tipo CC que atrae a eosinófilos, monocitos y linfocitos. Es una quimiotactina de eosinófilos potente y selectiva.

35.- Micro RNAs de interferencia.

36.- Factor 6 Asociado a Receptor de TNF.

37.- miR-146a es un miARN abundantemente expresado en varios tipos de células de mamíferos. miR-146a tiene múltiples pruebas de su implicación en la inflamación, la diferenciación y la función de las células inmunitarias adaptativas e innatas.

38.- Pequeños ARN no codificantes con una longitud de 80 a 150 nucleótidos producidos por la ARN polimerasa III. Forman parte de las partículas citoplasmáticas "bóveda", grandes partículas ribonucleoproteicas con una morfología en forma de barril.

39.- proteína de unión a guanilato inducida por interferón 1. Perteneciente a la superfamilia de dinamina de las grandes GTPasas. gGBP1 inhibe la producción de citoquinas mediante su actividad GTPasa.

influenzavirus H5N1, así como la producción de las citoquinas CCL2 y CXCL10<sup>40</sup>, inducidas por el virus (Jiang et al., 2024).

Los influenzavirus A H1N1, H3N2, H7N7, inducen en sus huéspedes la generación de secuencias largas intergénicas no codificantes de ARN (lincRNA), que denominan VIN. Winterling et al (2014) observan que la interacción de determinadas cepas de influenzavirus con la parte no codificante del genoma del hospedador, dando origen a estas VIN, se relaciona con la patogenicidad y virulencia del Influenzavirus. Los lncRNAs VIN potencian la infección por IV A suprimiendo la expresión de IFN e ISGs anti-IV (Wang et al., 2020). Así el lncNRAV<sup>41</sup> es sobretranscrito durante la infección por influenzavirus, lo que determina bajos niveles de ARNm para algunos ISGs<sup>42</sup> críticos (*ifit2*, *ifit3*, *ifitm3*, *oasl* y *mxs*), cuyas traducciones proteicas se reducen significativamente en las células que sobreexpresan el NRAV (Ouyang et al., 2014).

### Mecanismos de Defensa del IV

El virus contrapone a esta respuesta inmune innata su proteína NS1, que contiene un dominio N-terminal de unión a ARN (RBD) responsable de interactuar con el ARN de doble cadena, y una señal de localización nuclear (NLS) que se superpone con el RBD (Nogales et al., 2022; Marc, 2014); existe otra señal de localización nuclear en la NS1 de muchas cepas de IVs A, localizada en el dominio C-terminal (Greenspan et al., 1988); un dominio efector (ED) que contiene una señal de exportación nuclear (NES), que favorece la localización de la proteína NS1 tanto en el núcleo como en el citoplasma de la célula infectada por el IV (Li et al., 1998) y que interactúa con proteínas antivíricas inducidas por IFN (Thulasi Raman y Zhou, 2016; Nogales et al., 2018b); un dominio (en la cola C-terminal (CTT)) que contiene un motivo de unión a PDZ<sup>43</sup> que está asociado con la patogénesis de IVs A, pero que no está presente en todos los IVs (Hale, 2014). NS1 se une e impide tanto la ubiquitinación de TRIM25 como la de RIG-I mediada por Riplet, lo que resulta en una perturbación de la producción de IFN (Marc, 2014). En lugar de afectar al nivel de expresión de TRIM25, NS1 interactúa con el dominio central en bobina (CCD) de TRIM25 y suprime el cambio conformacional y en consecuencia la actividad enzimática de TRIM25, que es esencial para la ubiquitinación en el dominio CARD de RIG-I (Gack et al., 2009; Chiang et al., 2021). El influenzavirus utiliza la ubiquitina ligasa NEDD4<sup>44</sup> y la metiltransferasa SET7 para degradar la proteína antivírica IFITM3, que impide la entrada del virus influenza (Chesarino et al., 2015; Shan et al., 2013); mientras que la desmetilización de IFITM3 por LSD1<sup>45</sup> controla la proliferación vírica (Shan et al., 2017).

NS1 inhibe la síntesis de IFN mediante la interacción con el gen inducible por ácido retinoico (RIG-I) (Opitz et al., 2007; Mibayashi et al., 2007). La inhibición de la producción de IFN parece estar mediada por la interrupción de la formación de complejos RIG-I/MAVS (Hu et al., 2020; Gack et al., 2009; Rajsbaum et al 2012; Liedmann et al., 2014). La NS1 de diferentes cepas de IV evita la ubiquitinación y activación de RIG-I al suprimir la interacción con TRIM25, que es un requisito previo

40.- El ligando de quimiocina 10 (CXCL10), ó proteína 10 inducida por interferón gamma (IP-10) o citocina pequeña inducible B10. Quimioatrayente de macrófagos, LT, NK.

41.- Regulador negativo de respuesta antivírica.

42.- Genes inducidos por interferón.

43.- Dominio estructural común de 80-90 [aminoácidos](#) que se encuentra en [proteínas](#) de [señalización](#). Ayudan a anclar [proteínas transmembrana](#) al [citoesqueleto](#) y mantener unidos los complejos de señalización.

44.- Del inglés, *Neural Precursor Cell Expressed Developmentally Downregulated Protein 4*. Es una proteína-ubiquitina-ligasa E3, ubicada en el citoplasma que marca proteínas para ser degradadas en el proteosoma.

45.- La desmetilasa 1 específica de lisina (LSD1) funciona como un corregulador transcripcional al modular la metilación de histonas.

para mediar la ubiquitinación de RIG-I (Gack et al., 2009; Koliopoulus et al., 2018; Sánchez-Aparicio et al., 2017). Además, el dominio de unión a receptor de la NS1 de la cepa H1N1 de 1918 se adhiere directamente al dominio CARD de RIG-I, bloqueando su ubiquitinación (Jureka et al., 2015). NS1 también puede inhibir el factor regulador de IFN (IRF3), la proteína activadora 1 (AP-1) (Ludwig et al., 2002) e impedir la activación del factor nuclear kappa B (NF-κB), con lo que no se inducirán los genes antivíricos derivados de la traslocación al núcleo de aquella (Wang et al., 2000; Gao et al., 2012). NS1 inhibe determinados genes antivíricos inducidos por IFN (ISGs), tales como la PKR (proteína quinasa dependiente de RNA) ó la 2',5'-oligoadenilato sintetasa-Ribonucleasa L (Nogales et al., 2018b). La proteína NS1 del influenzavirus compite con OAS (oligoadenilato sintetasa) por la unión al ARNv, con lo cual atenúa la actividad antivírica de aquella (Min et Krug, 2006 en Husain, 2024); además, el virus de la gripe puede escapar a esta restricción por OASL en humanos portadores del SNP<sup>46</sup> rs10774671 en el gen *oas1* (Sánchez-González et al., 2021 en Husain, 2024).

A la vez NS1 puede inhibir la activación del inflammasoma por interacción con el dominio de la pirina de la familia NLR que contiene (NLRP3)<sup>47</sup> (Park et al., 2018; Moriyama et al., 2016; Chung et al., 2015). NS1 puede inhibir la exportación de ARNm del huésped desde el núcleo, al impedir el procesamiento de sus extremos 3', cesando la elaboración de proteínas del huésped (IFN, ISG y pro-inflamatorias), en favor del IV infectante, mediante la interacción con componentes de la maquinaria celular de procesamiento del preARNm, como el factor 30 de escisión y especificidad de poliadenilación (CPSF30) y la proteína II de unión a poli(A) (PABPII) (Chen et al., 1999; Noah et al., 2003). La proteína NS1 también está involucrada en la síntesis de ARN viral y la replicación viral, la traducción, y los polimorfismos NS1 acumulados a lo largo del tiempo pueden ser importantes para la adaptación del huésped a través de múltiples interacciones proteína-proteína (Nogales et al., 2022; Thulasi Raman y Zhou, 2016; Clark et al., 2017; Nogales et al., 2017f; Chauche et al., 2018; Nogales et al., 2018a; Evseev y Magor, 2021). Debido a la alta variabilidad de las funciones de NS1 en los IV A y las interacciones con otros factores del virus y del huésped, el efecto de los truncamientos de NS1, o su eliminación, podría, por lo tanto, ser diferente entre las cepas de IV A que infectan diferentes especies animales (Nogales et al., 2022).

Las mutaciones de la proteína NS1 pueden impedir su función inhibitoria, resultando en una respuesta inmune más fuerte (Jureka et al., 2015,20).

Además de la proteína NS1, la PB1-F2 del IV es capaz de desregular las respuestas inmunes innatas, inhibiendo la inducción de IFN de tipo I actuando contra MAVS (Varga et al., 2011,12). Park et al (2019) observan que la proteína PB1-F2 de la cepa H1N1/1918 altamente patógena dirige a la helicasa DDX3 a la degradación proteosómica, lo que antagoniza la vía IFN. Du et al. (2020) demuestran que el IV, mediante degradación mediada por la ubiquitina de JAK1<sup>48</sup>, inhibe la acción de los IFN-I y II, como mecanismo de evasión inmune.

46.- Polimorfismo de Nucleótido Único.

47.- Complejo de señalización que activa la procaspasa-1 e induce el procesamiento de las citoquinas inflamatorias dependientes de caspasa-1(particularmente IL-1b e IL-18).

48.- Los IFN de tipo I son citocinas que modulan la respuesta inmune innata ante infecciones, principalmente virales y que tienen actividades antiproliferativa. Poseen receptores expresados en la mayoría de los tipos celulares del organismo y formados por las subunidades IFNAR1 (del inglés, *Interferon Alpha Receptor 1*). En esta vía de señalización, participan las cinasas **TYK2** (del inglés, *Tyrosine-Kinase 2*) y **JAK1** (del inglés, *Janus-Activated Kinases 1*), que activan al complejo proteico ISGF3 (del inglés, *Interferon Stimulated Gene Factor 3*) integrado por **STAT1** (del inglés, *Signal Transducer and Activator of Transcription 1*), STAT2 (del inglés, *Signal Transducer and Activator of Transcription 2*) e **IRF9** (del inglés, *Interferon Regulatory Factor 9*) que al translocarse al núcleo, funciona como un factor de transcripción e induce a un gran número de **ISGs** (del inglés, *Interferon Stimulated Genes*) (Cho et Kelsall, 2014).

M2 interactúa con la proteína de choque térmico HSP40, que a su vez actúa con *p58* (IPK) (inhibidor de la proteína quinasa activada por ARN de doble cadena inducida por interferón) construyendo un complejo que regula la activación, así como la autofosforilación de la PKR (proteína quinasa activada por interferón dependiente de ARN de doble cadena) (Guan et al., 2010), que es uno de los componentes esenciales de la respuesta de defensa del huésped tras la infección vírica. La interacción y activación de PKR eventualmente induce la muerte celular.

**Escape Inmune:** Una sola mutación en un virus de la gripe a veces puede darle el poder de evadir el 90% de la inmunidad de anticuerpos en un individuo; sin embargo esta misma mutación en otro, aún de la misma especie podría no tener efecto evasivo. Esto implica la existencia de una diferente susceptibilidad a la influenza entre individuos humanos (Lee et al., 2019). En todo caso esta variación, o deslizamiento antigénico no se aprecia en hurones infectados artificialmente (Lee et al., 2019). En suinos la evasión del sistema inmune se basa fundamentalmente en el reagrupamiento genético de distintos Influenzavirus que hayan infectado al mismo individuo (Lee et al., 2019).

## ● LA UBIQUITINACIÓN EN LA HOMEOSTASIA INMUNE Y EN LA INTERACCIÓN VIRUS/HUÉSPED:

La ubiquitinación es fundamental en la interacción entre las proteínas del influenzavirus, que tratan de que este se replique y se expanda y las proteínas del huésped que pretenden la inhibición del Influenzavirus. Tras la infección celular por IV, la célula huésped utiliza el proceso de ubiquitinación para marcar y destruir los sustratos víricos y así controlar la transmisión del virus; y alternativamente utiliza la desubiquitinación (Valerdi et al., 2021; Wang et al., 2018; Fletcher et al., 2015). Así la ciclofilina A celular ubiquitina a la M1 para su proteólisis (Liu et al., 2012), lo que origina la reducción de la replicación del Influenzavirus, pues la interacción de M1 con ciclofilina determina la degradación de la primera en el proteosoma, mediante ubiquitinación (Park et al., 2022).

Las subunidades de la polimerasa vírica PA y PB2 son ubiquitinadas por la proteína antivírica de tipo dedos de zinc (ZAPL) asociada a PARP y degradadas en el proteosoma (Liu et al., 2015). La familia de proteínas con motivos tripartitos (TRIM) y las enzimas DUB (proteasas desubiquitinantes), defienden al organismo de la infección por Influenzavirus; así TRIM14, TRIM22, TRIM32 y TRIM41, que mantienen la actividad de la ubiquitina ligasa E3, se dirigen contra proteínas del IV, para detener la infección (Wu et al., 2019; Patil et al., 2018; di Pietro et al., 2015; Fu et al., 2015).

### **Interacción molecular IV/Huésped:**

La vía celular de la ubiquitina afecta todos los pasos del ciclo del IV. La ubiquitinación suprime la replicación al dirigirse a las proteínas víricas para su degradación y a la vez estimula las vías de señalización antivirales innatas.

Pero la ubiquitinación también puede favorecer la replicación del IV, ya que facilita la entrada del virus en la célula y el desmontaje del virión. Su et al. (2013) identificaron a Itch, una ubiquitina ligasa E3, como un factor clave para la liberación del IV desde los endosomas. Itch interactúa con la proteína M1 del IV, la ubiquitina y degrada, lo que permite la liberación de las RNPs víricas, contenidas en el endosoma tras la internalización en la célula, al citoplasma (Lin et al., 2017), para que posteriormente puedan ser trasladados al núcleo. La ubiquitinación de M2 en su residuo K78 facilita la interacción M1-M2 (Proteína de envoltura M2, Canal Iónico), lo que facilita la incorporación del ARNv neoformado al nuevo virión (Su et al., 2018; Valerdi et al., 2021).

La ubiquitinación en K78 de la M2 facilita la apoptosis inducida por influenzavirus y la autofagia de las células huésped; es decir el Influenzavirus puede controlar la muerte celular y con esta la diseminación tisular del virus (Su et al., 2018; Karim et al., 2020), aunque permite que M2 bloquee la autofagia (Guan et al., 2010). M2 interactúa con la proteína de choque térmico HSP40, que a su vez

actúa con *p58* (IPK) (inhibidor de la proteína quinasa activada por ARN de doble cadena inducida por interferón) construyendo un complejo que regula la activación, así como la autofosforilación del PKR (proteína quinasa activada por interferón dependiente de ARN de doble cadena) (Guan et al., 2010), que es uno de los componentes esenciales de la respuesta de defensa del huésped tras la infección viral. La interacción y activación de PKR eventualmente induce la muerte celular. Influenzavirus con mutación K78R (lisina sustituida por arginina en la posición 78) de M2 induce autofagia y apoptosis más rápidamente que el virus WT (tipo salvaje) (Su et al., 2018); esta mutación disminuye la virulencia, disminuye la replicación vírica, pero puede dar lugar a una mayor destrucción celular y tisular en el hospedador, lo que origina cuadros más graves en algunos animales infectados.

El **estado de ubiquitinación de NP** tiene funciones tanto provirales como antivirales, mediante monoubiquitinación y poliubiquitinación; y junto a la modulación equilibrada entre la ubiquitinación y la desubiquitinación de NP, pueden determinar la eficacia de la infección por este virus (Park et al., 2022). En el ensamblaje de las RNPs la ubiquitinación de las proteínas del trómero-polimerasa y de la NP, consiste en la conjugación de la proteína ubiquitina a residuos específicos de lisina en proteínas-sustrato. Esto sigue a una cascada de reacciones que transfieren la ubiquitina de la proteína activadora de la ubiquitina E1 a la proteína de conjugación de la ubiquitina E2 y en última instancia, la ligasa de ubiquitina E3 une la ubiquitina al sustrato (Komander et Rape, 2012). La monoubiquitinación une una sola fracción de ubiquitina a los sitios de una proteína sustrato, mientras que la poliubiquitinación une cadenas de ubiquitina. El enlace específico entre las fracciones de ubiquitina en una cadena determina el impacto de la poliubiquitinación en la proteína objetivo.

La nucleoproteína (NP) es una proteína estructural del virus de la gripe y su actividad está regulada por la ubiquitinación. NP tiene varios sitios objetivos potenciales de ubiquitinación, como K184, K227 y K273, todos los cuales residen en el dominio de unión de la NP al ARN (Lin et al., 2017). La monoubiquitinación puede modular la unión de NP al ARN (Park et al., 2022). La monoubiquitinación de la NP en K184 por la ligasa E3 del huésped, mejora la replicación vírica y la actividad de vRNP (Liao et al., 2010), presumiblemente por el aumento de la unión al ARN, la estabilización del ARNc y la actividad vírica aumentada de RdRp (aumento de la transcripción y replicación por la polimerasa del IV A) (Valerdi et al., 2021; Lin et al., 2017; Marques et al., 2019). La ubiquitinación en K184 también puede ser modulada por la desubiquitinasa huésped USP11, lo que resulta en una disminución de la actividad de la polimerasa y una replicación vírica reducida. La competencia entre la actividad de monoubiquitinación K184 y la actividad de desubiquitinación inducida por USP11 de la NP determina el resultado final de la actividad de unión al ARN y la replicación del IV (Park et al., 2022). Además de la regulación de la actividad de la NP inducida por la monoubiquitinación, el nivel de NP puede modularse por poliubiquitinación; así TRIM14, TRIM22 y TRIM41 se unen a NP, lo que induce su poliubiquitinación y degradación y como consecuencia en el transporte reducido de NP hacia el núcleo celular (donde se realiza la replicación del genoma de los IVs), la inhibición de la formación de vRNP y de la replicación del ARN genómico (Lamotte et Tafforeau, 2021). TRIM14 y TRIM41 ubiquitinan la NP vírica y la degradan; con lo que no pueden formarse RNPs víricas, así impiden la replicación del genoma de Influenzavirus infectante (Wu et al., 2019; Patil et al., 2018). Por su parte TRIM22 incrementa la poliubiquitinación de la NP en la posición K48, y la envía a la degradación en el proteosoma (di Pietro et al., 2013). Por el contrario, también se ha descubierto que la NP puede ser poliubiquitinada en otros residuos de lisina por ligasas E3, y estas modificaciones no están relacionadas con la degradación de NP, sino con otras regulaciones.

Las NPs componentes de las ribonucleoproteínas son ubiquitinadas, lo que puede dificultar la replicación del virus (Kirui et al., 2016). Una ubiquitinación deficiente obstaculiza la función de las RNPs (Kirui et al., 2016); la nucleoproteína vírica monoubiquitinada y desubiquitinada en su lisina 184, por la ligasa E3 CNOT4 (CNOT4 funciona como una ubiquitina-proteína ligasa -E3-), lo que

permite el incremento de la actividad de la ARN polimerasa vírica, dependiente del ARN vírico, lo que facilita la replicación vírica (Lin et al., 2017; Park et al. 2022). La ubiquitinación regula varios procesos celulares; sin embargo, las cadenas de poliubiquitina unidas a través de la lisina 48 (K48) se asocian más comúnmente con la degradación de proteínas a través del proteosoma, mientras que las cadenas unidas por la lisina 63 (K63) están involucradas en el tráfico endocítico, lo que potencialmente conduce a la degradación lisosómica y a la modificación ribosómica. La vía de la ubiquitina-proteosoma afecta a múltiples pasos en el ciclo del virus de la gripe, y la inhibición de esta vía es perjudicial para el virus (Widjaja et al., 2010).

La enzima DUB USP11 impide la replicación del ARN del influenzavirus (ARNv) mediante la eliminación del enlace de la ubiquitina NP K184 para reducir la afinidad de unión al NP del ARN complementario (ARNc) (Liao et al., 2010). Como contraparte, la ubiquitina ligasa, CNOT4, invierte la acción de USP11 y, por lo tanto, mejora la actividad de los vRNP y la replicación del ARNv (Lin et al., 2017).

O sea, la ubiquitinación de la NP puede ser tanto ventajosa como desventajosa para la infección por Influenzavirus; lo que significa que el equilibrio de estos mecanismos reguladores dicta la efectividad de la infección por IAV (Park et al., 2022).

### **Ubiquitinación en el trímero polimerasa.**

La aparición de enfermedad y lesiones depende del resultado de la interacción del sistema inmune del individuo infectado y el Influenzavirus infectante; en esta interacción resultan muy importantes los procesos de ubiquitinación en el trímero polimerasa.

La polimerasa básica 2 (PB2) es ubiquitinada por las ligasas CRL4<sup>49</sup> E3, lo que incrementa su acción, favoreciendo la replicación del Influenzavirus (Karim et al., 2020). Las cascadas inducidas por la infección elevan la ubiquitinación de la proteína vírica M1 para apoyar la liberación de los viriones recién ensamblados (Su et al., 2013). El complejo trimérico RdRp de IAV comprende tres subunidades: la PB1 (polimerasa básica 1), la PB2 (polimerasa básica 2) y la PA (polimerasa ácida) que se une a cada extremo del ARN genómico viral. Algunos de sus fragmentos, como PB1-F2, están sometidos a una regulación dependiente de la ubiquitinación (Park et al., 2022). Así la ubiquitina ligasa E3 TRIM32 se une a PB1 e induce su ubiquitinación en su dominio K48, lo que reduce su actividad (Fu et al., 2015). También la poliubiquitinación en PB2 y PA limita la estabilidad de las proteínas, con lo que reduce la actividad de la polimerasa vírica (Liu et al., 2015). En este caso, la proteína antivírica ZAPL<sup>50</sup>-PARP-13.1<sup>51</sup>, se une a los ARNm víricos por su dominio N-terminal “dedos de Zinc” e induce su degradación, mediante la unión a las polimerasas víricas PB2 y PA a través del dominio C-terminal PARP y WWE<sup>52</sup>, lo que induce su degradación proteosómica (Liu et al., 2015). Sin embargo la polimerasa PB1 se une cerca del dominio PARP de la ZAPL e induce la disociación de las PB2 y PA de ZAPL, permitiendo que el virus escape de la degradación (Liu et al., 2015; Park et al., 2022).

Alternativamente la ubiquitinación de PB2 favorece un proceso óptimo de infección por el IV (Karim et al., 2020). Para este proceso se precisan dos ligasas tipo RING-E3 multicomponentes (ubiqui-

49.- Cullin-RING E3 ubiquitina ligasas.

50.- ISOFORMA (L) Zinc Finger Antiviral Protein.

51.- La familia de polimerasas (del inglés Poly (ADP-ribose) Polymerases PARP) es una familia de proteínas implicadas en un gran número de procesos celulares que implican principalmente reparación de ADN y muerte programada de la célula.

52.- Motivo de interacción de proteínas que contiene triptofano-triptofano-ác. glutámico.

tinias ligasas similares a los dedos de Zinc RING<sup>53</sup>), basadas en Cullin-4<sup>54</sup> (CRL4-Cullin Ring Ligasa) (complejo multiproteico que une la enzima conjugadora de ubiquitina E2, a un receptor de ubiquitina, la proteína diana): una es DCAF12L1 (DDB1-and Cul4 factor-associated factor); y la otra que incluye DCAF11 como factores de reconocimiento de sustrato (SRF) además del adaptador DDB1 (DNA damage-binding protein 1). La unión de CRL4s a PB2 requiere interacción tanto con el adaptador DDB1 como con los receptores de sustrato DCAF, lo que proporciona puntos reguladores adicionales (Park et al., 2022). La región C-terminal de PB2 contiene la mayoría de los residuos de lisina objetivo de ubiquitinación, mientras que la N-terminal no muestra ubiquitinación significativa (Park et al., 2022). En comparación con las señales típicas de ubiquitina K48 y K63, la ubiquitinación K29 se ha implicado en vías independientes del proteosoma, como la regulación de la señalización Wnt<sup>55</sup> (Fei et al., 2013), la inmunidad antiviral innata (Yu et al., 2016) o la agregación de proteínas (Nucifora et al., 2016). Los virus recombinantes que albergan mutaciones en los residuos diana de lisina dieron como resultado un menor crecimiento del virus, lo que implica que la ubiquitinación de PB2 dependiente de CRL4 promueve la infección por IV A. Biquand et al. (2017) demuestran que la producción de virus disminuyó al silenciar la vía CRL4 y aumenta por la expresión ectópica de DDB1 y DCAF11.

Es decir, a diferencia de los procesos de activación de UPS<sup>56</sup>, la ubiquitinación inducida por CRL4 de PB2 consiste principalmente en enlaces K29 atípicos, que no causan su destrucción ni los cambios en la actividad de transcripción/replicación de la polimerasa (Karim et al., 2020).

En definitiva, la ubiquitinación de PB2, PB1, PA y NP sin actividad proteosómica, es decir sin su degradación proteosómica juega un papel proviral (Kirui et al., 2016; Liu et al., 2015; Liao et al., 2010; Fu et al., 2015). La ubiquitinación proteosómica de la polimerasa y de la NP víricas dificulta la transcripción del ARNm vírico, el ARNc intermedio de replicación y el ARNc final.

**Difusión Celular del IV: La ubiquitinación de la proteína M2 del Influenzavirus mejora el empaquetamiento del genoma vírico, lo que favorece su envasado en las partículas de virus. A la vez regula la apoptosis y la autofagia, lo que beneficia la propagación vírica (Su et al., 2018).**

La ubiquitinación en K78 de M2 facilita la apoptosis inducida por influenzavirus y la autofagia de las células huésped; es decir el Influenzavirus puede controlar la muerte celular y con ésta su propagación (Su et al., 2018; Karim et al., 2020), aunque permite que M2 bloquee la autofagia (Guan et al., 2010). Un factor asociado a la alta patogenicidad es la Incapacidad de MARCH8<sup>57</sup> para degradar, mediante poliubiquitinación, a la proteína M2 del IV (Yu et al., 2023). En IVs de baja patogenicidad MARCH8 ubiquitina las glicoproteínas de superficie, y secuestra la proteasa Furina, mediante su motivo de tirosina C-terminal, impidiendo así la liberación de los viriones de la superficie celular (Yu et al., 2023; Villalon-Letlier et al., 2022; Liu et al., 2021). Los IVs con mutación K78R (lisina sustituida por arginina en la posición 78) de M2 inducen autofagia y apoptosis más rápidamente que el virus WT (tipo salvaje) (Su et al., 2018); esta mutación disminuye la virulencia, disminuye la replicación vírica, pero puede dar lugar a una mayor destrucción celular y tisular en el hospedador, lo

53.- Abreviatura de Really Interesting New Gene.

54.- Proteínas que tienen una importante función en la regulación del ciclo celular y como componentes de las UBIQUITINA-PROTEINA LIGASAS.

55.- Grupo de proteínas del grupo de moléculas de señalización, que regulan el crecimiento, la motilidad y la diferenciación celular durante el desarrollo embrionario. Actúan de manera paracrina activando diversas cascadas de señalización dentro de las células diana.

56.- Complejo Ubiquitina Proteosoma (Ubiquitin Proteasome System).

57.- proteína RING-CH 8 asociada a la membrana celular huésped. Miembro de la familia ubiquitina ligasa E3.

que origina cuadros más graves en algunos animales infectados. En los virus influenza de alta patogenicidad, las posiciones 78 y 79 de la M2 no corresponden a lisinas; en estos la acción de MARCH está inhibida por la falta de poliubiquitinación, lo que hace más virulentos a los IVs resistentes a esta acción antivírica del huésped (Liu et al., 2021).

### **La proteína no estructural 1 (NS1)**

La primera y principal respuesta del organismo animal tras la infección por IVs se basa en la producción de interferones de tipo I. El IV contrapone a estos la acción de su proteína no estructural NS1. Generalmente está constituida por 230 aminoácidos, aunque su longitud puede variar debido a las mutaciones que afectan la disponibilidad de codones de parada. Regula la maquinaria de traducción del huésped, así como eventos de poliadenilación para la inhibición de las respuestas inmunitarias innatas del huésped, fundamentalmente la producción de IFN (Hale et al., 2008; Krug, 2015). Uno de los reguladores clave de la producción de IFN es la vía de señalización TRIM25-RIG-I, un sensor de ARNv.

La ubiquitinación en el dominio CARD de RIG-I en la lisina63 es inducida por TRIM25 y permite la producción de IFN. La proteína NS1 se une y suprime la ubiquitinación del dominio N-terminal de RIG-I mediada por TRIM25 y la ligasa Riplet E3<sup>58</sup> humana, lo que resulta en una perturbación de la producción de IFN. En lugar de afectar al nivel de expresión de TRIM25, NS1 interactúa con la parte CCD de TRIM25 (dominio coiled-coil ó bobina enrollada) y deshace la multimerización y la actividad enzimática de TRIM25, que es esencial para la ubiquitinación en RIG-I (Gack et al., 2009). Paralelamente la no formación de complejos RIG-I/MAVS inhibe la producción de IFN (Gack et al., 2009; Hu et al., 2020; Rajsbaum et al., 2012; Lindmann et al., 2014).

No obstante existen otras vías de activación de IFN-I, las desencadenadas por la activación de los TLR3 y TLR7, pero también pueden ser inhibidas por NS1 mediante la ubiquitina ligasa TRAF3<sup>59</sup> E3: NS1 se une y suprime la ubiquitinación vinculada a TRAF3 en K63, lo que resulta en la inhibición de la expresión de los genes de IFN (Lin et al., 2021). NS1 lleva un motivo FTEE conservado (aminoácidos 150–153) ácido glutámico en las posiciones 152 y 153 que son críticos para la unión de TRAF3 para bloquear la ubiquitinación de TRAF3 y la consecuente producción de IFN tipo I (Lin et al., 2021). Cuando existe la mutación de estos dos residuos de ácido glutámico a alanina (E152, 153 de la NS1) la producción de IFN de tipo I se incrementa, y los ratones infectados exhiben una clínica atenuada; lo que sugiere el papel esencial de la modulación de TRAF3 por NS1 que antagoniza la respuesta de interferón del huésped (Park et al., 2022).

NS1 puede modular la señalización JAK-STAT por un mecanismo epigenético: NS1 interactúa exclusivamente con la ADN metiltransferasa 3B (DNMT3B), y la disocia en los promotores de los genes reguladores JAK-STAT. Además, la unión de NS1 con DNMT3B la transporta al citosol y promueve la ubiquitinación ligada a K48 y la degradación de DNMT3B (Liu et al., 2019), lo que puede reducir aún más la metilación del ADN en los genes de los principales componentes JAK-STAT. Para Park et al. (2022) esto significa que NS1 puede modular el mecanismo epigenético de la respuesta inmunitaria del huésped, al menos en parte, alterando la localización celular de los reguladores epigenéticos, así como la actividad del proteosoma mediada por la ubiquitinación.

**La hemaglutinina** del Influenzavirus, en concreto su subunidad 1, puede inducir la ubiquitinación de las moléculas inductoras de IFN. El IV induce la fosforilación y la ubiquitinación de la

58.- Ubiquitina ligasa activa las proteínas a través de cadenas ancladas a K63-ubiquitina.

59.- Proteína 3 de la familia de proteínas del factor asociado al receptor del TNF (TRAF).

subunidad 1 de IFNAR (IFNAR1)<sup>60</sup>, resultando en la degradación de IFNAR1 y en consecuencia en la atenuación de las respuestas de IFN de tipo I (Xia et al., 2015). La hemaglutinina del IV induce la ubiquitinación de IFNAR1, suprimiendo su expresión, pero sin afectar el nivel del ARNm de IFNAR1 ni modular la respuesta al estrés del retículo endoplásmico. La ubiquitinación inducida por la HA y la disminución de la expresión de IFNAR1 es otro mecanismo de evasión adoptado por el virus para evitar el sistema inmune del huésped (Park et al., 2022).

**La neuraminidasa** del virus influenza (NA) se glicosila por un mecanismo de modificación post traduccional (PTM), tras la infección celular por el Influenzavirus (Zhang et al., 2021).

El sistema de ubiquitina-proteosoma puede tener también un papel pro-vírico, puesto que todas las proteínas que intervienen en la replicación del IV están sujetas a ubiquitinación, al menos potencialmente y es especialmente importante para una actividad óptima de la polimerasa vírica. Por lo tanto, es probable que la manipulación de la maquinaria de la ubiquitina, en beneficio terapéutico interrumpa o perturbe la función de múltiples proteínas víricas en distintas etapas del curso de la infección/enfermedad infecciosa.

En 2022 Park et al. demuestran el papel preponderante de la PB1-F2 del H1N1 causante de la pandemia de 1918. Resultando que esta proteína del IV está sometida a una extensa proteólisis dependiente de la ubiquitina; PB1-F2 es un potente inductor de citoquinas proinflamatorias, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, y CXCL1/KC (el principal quimioatrayente de neutrófilos) (Fukuyama et al., 2011). Además de la interferencia por la vía dependiente de las mitocondrias de la señalización IFN de tipo I, la PB1-F2 de 1918 actúa sobre la helicasa DEAD-box DDX3 (importante mediador en la señalización de IFN), conduciéndolo a la vía de degradación proteosómica. Lo que podría explicar, al menos en parte, la alta virulencia de la influenza pandémica de 1918 (Park et al., 2019). El análisis de interacción proteína-proteína reveló que la PB1-F2 de 1918, pero no la PB1-F2 del influenzavirus modificado PR8, se une a la helicasa DDX3 y la regula a la baja. La DDX3 recombinante recuperó completamente a los ratones de la infección fatal por IAV (1918) mediante la restitución de la inducción de IFN- $\beta$  y la consecuente reducción del título vírico pulmonar (Park et al., 2019). Estos resultados sugieren que las vías del sistema ubiquitina-proteosoma no solo regulan directamente la actividad/nivel de las proteínas de los componentes víricos, sino que también pueden comodular los factores esenciales del huésped al secuestrarlos y dirigirlos a la vía UPS<sup>61</sup> interactuando con PB1-F2.

Las modificaciones en la ubiquitinación de proteínas víricas y del huésped son vitales para la regulación de las respuestas inmunes y la supervivencia de los virus (Park et al., 2022): Por un lado, la ubiquitinación estimula al sistema inmune a combatir la infección vírica; contrariamente a los intereses del huésped la ubiquitinación desempeña una función en favor de la replicación del IV, contribuyendo al ensamblaje de nuevos viriones, mejorando la actividad de proteínas víricas, como la NS1, la NP y las polimerasas, además de bloquear la respuesta de IFN. La ubiquitinación del sensor de ARN RIG-I es inducida específicamente por el virus de la gripe A, para activar la producción de IFN de tipo I. El virus de la influenza modula la actividad de las principales proteínas antivíricas en la célula huésped, de modo que le permitan realizar el ciclo de replicación. Sus proteínas estructurales, no estructurales y auxiliares y especialmente las proteínas de la matriz y el complejo polimerasa pueden regular la inmunidad del huésped y la respuesta antivírica. La polimerasa PB1-F2 del IV A mutado de 1918, adopta una nueva función antagonista del IFN enviando la helicasa DDX3 a la degradación proteosómica (Park et al., 2022), como detallamos más abajo.

60.- Subunidad 1 del Receptor de Interferón  $\alpha/\beta$ .

61.- Proteasas específicas de ubiquitina.

En este sentido y como ejemplo de lo expresado anteriormente, tenemos la pandemia de 1918 por el IV A/H1N1, que causó 20 millones de muertes humanas en todo el mundo (Beveridge, 1991, 99]. La alta patogenicidad de la pandemia de 1918 se muestra debida a una proteína específica en el Influenzavirus A H1N1/1918 (McAuley et al., 2007, 15). Mutaciones en la proteína PB1-F2 son responsables de la patogénesis del Influenzavirus H1N1 en la pandemia de 1918, aunque también contribuyó a la elevada patogénesis la activación temprana del inflammasoma NLRP3 (McAuley et al., 2013; Park et al., 2018). PB1-F2 de 1918 está sujeto a una extensa proteólisis dependiente de ubiquitina (Park et al., 2018), y se relaciona con la supresión de señalización de IFN-1: PB1-F2 del IV se une a la helicasa DDX3 del huésped y ambos son degradados en el proteosoma; al estar unidos, DDX3 se degrada rápidamente, agotando así la señalización para IFN-I. El IV A/H1N1/1918 que contiene su PB1-F2 mutada tiene una replicación muy alta, (exhibe hasta 12 mutaciones de aminoácidos, respecto a los H1N1 circulantes), lo que impide su eliminación de los pulmones, y por tanto contribuye a la mayor patogenicidad (Park et al., 2018, 22). En el IV PR38 (Influenzavirus H1N1/1918, adaptado a ratón), las mutaciones I68T y L69P de 1918 en su PB1-F2, son determinantes para la unión DDX3 y cruciales para el aumento de la patogenicidad en ratones. Chakrabarti y Pasricha (2013) demuestran que más del 80 % de los aislamientos de IV A/H1N1 que infectan a los seres humanos mostraron la modificación de la proteína PB1-F2, mientras que la mayoría de los aislados de A/H1N1 aviáres retuvieron su ORF original.

Como perspectiva con respecto a la ubiquitinación de las proteínas del virus de la influenza, modular la vía de la ubiquitina, ayudará a desarrollar nuevas alternativas y antivirales frente a influenzavirus altamente patogénos, susceptibles de causar pandemias.

## ■ LESIONES

La infección por Influenzavirus de las células del huésped vertebrado, da lugar a un estado oxidativo con producción de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (RONS), autofagia, muerte celular, inhibición del mTOR<sup>62</sup>, (Paiva et al, 2014). Las ROS actúan como «mensajeros redox» en las vías de señalización intracelular y su regulación, pero el exceso de ROS induce estrés oxidativo, en forma de peroxidación lipídica de la membrana celular, disfunción de orgánulos y respuesta inflamatoria (Huo et al., 2018). La producción endosómica de la oxidasa NOX2<sup>63</sup> induce inflamación de vías aéreas, especialmente a nivel pulmonar (To et al., 2019). Experimentalmente van Assche et al (2011) demuestran que la inhibición por apocinina de la NOX2 reduce los títulos víricos de influenza A H3N2 (X31) y H1N1 (PR8). Lo que da pie a pensar que, a diferencia de otros virus, los influenzavirus aviáres como el H5N1 de alta patogenicidad y otros virus mamíferos de patogenicidad elevada, incrementan su capacidad patogénica, aprovechando el estrés oxidativo (Geiler et al., 2010). Así la inhibición de NOX2 mantiene la actividad de los LT CD8<sup>+</sup> que producen IL-2, IFN $\gamma$  e IL-12 (Vlahos et al., 2011) lo que permite contener y/o eliminar los IV infectantes, así como controlar las sobreinfecciones bacterianas secundarias y la neumonía (To et al., 2019). La inducción de la activación de NRF2<sup>64</sup> (usando sulforafano y galato de epigallocatequina [EGCG]) puede reducir el título de influenza A H3N2 (Ban-

62.- Desde la perspectiva de la inmunidad antivírica, al tratarse de una proteína citoproliferativa, inhibe la apoptosis de células infectadas por virus.

63.- NADPH (Nicotiamida-Adenina Dinucleótido fosfato) oxidasa 2. Es una enzima generadora de superóxido que forma especies reactivas de oxígeno (ROS).

64.- El factor nuclear tipo eritroide 2 (Nrf2) es un factor de transcripción maestro para la defensa celular contra el estrés endógeno y exógeno al regular la expresión de muchos genes antioxidantes y de desintoxicación.

gkok/1/79), mientras que se ha demostrado que la inhibición de NRF2 (a través de shRNA<sup>65</sup> NRF2) aumenta la carga vírica epitelial (Kesic et al., 2011). El EGCG, activador de NRF2, es eficaz contra los virus H1N1, H3N2 y B. La activación de NRF2 induce la producción de IFN tipo I, RIG-I y MxA implicadas en los mecanismos viricidas.

La invasión del espacio alveolar por IV A, y la proliferación de estos, da lugar a neumonía, que puede ser mortal para el animal infectado. La enfermedad pulmonar intersticial asociada con bronquiolitis respiratoria es una forma de neumonía intersticial.

Tras la infección por IV aviares en mamíferos, PB1-F2 induce la acumulación de fibras de tipo amiloide, originando trastornos inmunopatológicos, al producir citotoxicidad (Vidic et al., 2016). De modo general los procesos neumónicos provocados por IV en mamíferos (y en menor medida en aves) producen alveolitis extensa, inflamación peribronquiolar e infiltración de células inflamatorias (neutrófilos), junto con denudación epitelial de las vías respiratorias e inflamación perivascular, en dependencia de la patogenicidad del IV infectante. La infiltración neutrofílica (Tumpey et al., 2005) puede originar una neumonía difusa, que varía presumiblemente en función de la virulencia y carga del IV infectante (Tate et al., 2009).

En los pulmones el principal factor patogénico debido a la infección por IVs es la inducción de muerte celular en el epitelio alveolar, que es consecuencia del estado de oxidación producido y que comienza con la señalización de fosfolípidos oxidados a través de la cascada iniciada con la señalización del TLR4, el adaptador inductor de interferón- $\beta$  (TRIF) y el factor 6 asociado al receptor TNF<sup>66</sup> (TRAF6). Las fuentes de producción de reactivos intermediarios de oxígeno son leucocitos y células pulmonares infectadas por influenzavirus, mediante la xantina oxidasa que se incrementa tras la infección por influenzavirus A (Akaike, 1990). Los ROS estimularían la producción de citoquinas y quimiocinas (IL6, IL8 y RANTES<sup>67</sup>), así como la expresión de genes proinflamatorios en las células infectadas por IV A (Knobil, 1998) y en los macrófagos y células epiteliales respiratorias, mediante la quinasa activada por mitógenos P38 y el NF- $\kappa$ B (Chan et al., 2005). Se produce una “tormenta de citoquinas”, una hipercitoquimemia. La activación de la vía desencadenada por el sensor TLR3, tras la infección experimental por IV A/H5N1 en ratones da lugar al mas amplio rango de producción de citoquinas (Huo et al., 2018). En humanos la infección por H5N1, origina un síndrome agudo de distrés respiratorio, como consecuencia del daño tisular inducido por la inflamación, causado por la liberación de quimiocinas proinflamatorias y el reclutamiento de neutrófilos, linfocitos y, en particular, fagocitos mononucleares en el espacio alveolar para limitar la propagación viral (de Jong et al., 2006).

Una lesión característica pulmonar en suinos es el denominado tablero de ajedrez. El IV se replica en las células epiteliales del aparato respiratorio (alto y bajo), alterando el funcionamiento del aparato mucociliar y provocando una neumonía broncointersticial, en concomitancia con infecciones bacterianas secundarias; el infiltrado linfocítico afecta al tejido peribronquial y septos alveolares, originando un exudado mucopurulento en los bronquiolos, una bronquiolitis necrotizante. La replicación del IV puede causar la muerte de la célula infectada; las células necróticas se desprenden en el lumen de la vía aérea y las células inflamatorias, principalmente neutrófilos, acuden al lugar de

65.- ARN de horquilla corta (shRNA) (se transcriben en el núcleo a partir de un vector que contiene un promotor Pol III. El shRNA, que contiene las secuencias de sentido y antisentido de un gen diana conectado por un bucle -en este caso el *nrf2*-, se transporta desde el núcleo al citoplasma donde la enzima Dicer lo procesa en ARN interferentes pequeños (siRNA) y actúa a través de la vía de interferencia del ARN impidiendo la traducción de la proteína).

66.- Factor de Necrosis Tumoral.

67.- Quimiocina de regulación por activación expresada y secretada por los linfocitos T. Quimiotactina eosinófilos, monocitos y linfocitos.

infección. En 24-48 horas se puede observar la lesión microscópica característica de bronquiolitis necropurulenta; las células epiteliales restantes se aplanan para cubrir la membrana basal (atenuación) y durante los 2-3 días siguientes las células epiteliales comienzan a multiplicarse hasta que empiezan a formar capas, una encima de otra (hiperplasia). A los 5-7 días, el virus ha cesado de replicarse y los tejidos comienzan a recuperarse. Las células necróticas y la inflamación desaparecen y el tejido puede volver a la normalidad a los 14-21 días de la infección (3TRES3, 2015), salvo en caso de infección bacteriana secundaria.

Macroscópicamente se observa la neumonía broncointersticial, caracterizada por la presencia de lesiones craneoventrales o multifocales, poligonales que representan lóbulos hundidos (cóncavos), de color rojo oscuro, y firmes al tacto. Estas son áreas donde los espacios de aire (alveolos) que rodean a los bronquiolos han colapsado (atelectasia lobular), debido a la obstrucción causada por las células necróticas y células inflamatorias en las vías respiratorias, de aspecto difuso de color rojo oscuro o marrón, de extensión variable (3tres3,2015, 20). La concavidad que presentan las áreas afectadas de la superficie pulmonar se vuelve convexa, si hay enfermedad bacteriana concomitante.

**SIGNOS CLÍNICOS Y LESIONES DE LA INFLUENZA AVIAR**

| SIGNOS CLÍNICOS                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | LESIONES                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <ul style="list-style-type: none"> <li>• Depresión severa, inapetencia</li> <li>• Marcada disminución de la producción de huevos</li> <li>• Edema facial con crestas y barbillas tumefactas y cianóticas</li> <li>• Hemorragias petequiales en las superficies de las membranas internas</li> <li>• Muertes súbitas (la mortalidad puede alcanzar 100%)</li> <li>• Aislamiento del virus necesario para un diagnóstico definitivo</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Las lesiones pueden estar ausentes en los casos de muerte súbita</li> <li>• Congestión grave de la musculatura</li> <li>• Deshidratación</li> <li>• Edema subcutáneo de la cabeza y del cuello</li> <li>• Secreciones nasal y oral</li> <li>• Congestión grave de la conjuntiva, a veces con petequia</li> <li>• Exudación mucosa excesiva en el lumen de la tráquea o traqueítis hemorrágica grave</li> <li>• Petequias en el interior del esternón, en la grasa serosa y abdominal, en las superficies serosas y en la cavidad corporal</li> <li>• Congestión renal severa, a veces con depósitos de urato en los túbulos</li> <li>• Hemorragias y degeneración de los ovarios</li> <li>• Hemorragias en la superficie de la mucosa del proventrículo, particularmente en la unión con la molleja</li> <li>• Hemorragias y erosiones de la mucosa de la molleja</li> <li>• Focos hemorrágicos en los tejidos linfoides de la mucosa intestinal</li> </ul> |

MANUAL PRÁCTICO DE OPERACIONES EN LA LUCHA CONTRA LA INFLUENZA AVIAR. MAPA.  
 SECRETARÍA GENERAL DE AGRICULTURA Y ALIMENTACIÓN.  
 DIRECCIÓN GENERAL DE SANIDAD DE LA PRODUCCIÓN AGROALIMENTARIA Y BIENESTAR ANIMAL.  
 SUBDIRECCIÓN GENERAL DE SANIDAD E HIGIENE ANIMAL Y TRAZABILIDAD (2024)

Tras la infección de las aves, por vía respiratoria, oral ú ocular, los IVs se adhieren al receptor a-2,3 de las células epiteliales de las mucosas de los aparatos respiratorio y digestivo de las aves y se replican en ellas. Cuando se trata de IVs de alta patogenicidad se produce viremia, en dependencia de la carga vírica infectante y de la capacidad de respuesta inmune del ave; los virus se replican en el endotelio vascular y el IV se difunde por todo el organismo aviar, llegando a encéfalo, hígado, riñón y linfa, originando apoptosis de células inmunes, dando lugar a inmunodepresión. Los IVs aviáres de alta patogenicidad aglutinan los eritrocitos de las aves infectadas, se produce una hemaglutinación intravascular diseminada, en dependencia de la carga vírica circulante y de la respuesta inmune (en forma de anticuerpos neutralizantes), que dificulta la circulación sanguínea originando éxtasis sanguíneo a nivel capilar, que unido al deterioro del epitelio vascular originado por la replicación de los IVs provoca colapso circulatorio, fallo multiorgánico y muerte súbita del ave. En casos no peragudos, puede observarse emaciación, depresión severa, somnolencia, plumaje erizado, cianosis de cresta y barbillas, cabeza hinchada, disnea, diarrea y sobre todo numerosas áreas hemorrágicas amplias y asociadas a edema subcutáneo en las regiones del esternón, de los metatarsos y de las falanges. También se observan hiperemia y numerosas hemorragias en la mucosa tráqueal, proventrículo subcenturiado y en la mucosa intestinal, así como en pulmón en el que en algunas aves aparece neumonía intersticial (Quintana López, 2015).

Hernández Magdaleno (1998) comprobó que la hemorragia es la lesión predominante en las aves infectadas con el virus de IAAP.

## ■ CONTROL

La transmisión interespecífica hombre-cerdo, hombre gato, evidencia la necesidad de implementar medidas de control, para salvaguardar la sanidad animal y la salud pública.

El aumento de la prevalencia del virus A(H5N1) en hospedadores aviáres atípicos y su transmisión a especies mamíferas y con posterior transmisión entre ellas, pone de relieve la importancia para la salud pública de mantener la vigilancia de la enfermedad y los protocolos de bioseguridad.

El Control de la Influenza, como Zoonosis, pasa necesariamente por la colaboración entre la Sanidad Animal y la Salud Pública (OMS, 2006; Arteaga et al., 2006).

En AVES, debido al tiempo necesario para desarrollar inmunidad, la variación de la efectividad de la vacuna y el potencial de transmisión del virus durante las prácticas de vacunación, el sacrificio inmediato de las aves de corral es más eficaz para erradicar los brotes y controlar la propagación secundaria.

EFSA en 2023 realizó unas simulaciones de modelos en Francia, Italia y los Países Bajos. Sus resultados revelaron que:

- las granjas de patos y pavos son más infecciosas que los pollos (gallinas).
- el vaciado sanitario de las granjas infectadas por sí solo no controla totalmente la propagación de la enfermedad, mientras que el sacrificio en anillo de 1 km resulta tan o más efectivo mejor que la vacunación preventiva de emergencia en anillo, aunque con el mayor número de granjas despobladas.
- la vacunación preventiva de las especies más susceptibles en áreas de alto riesgo de transmisión fue la mejor opción para minimizar el número y la duración de los brotes.
- durante los brotes en dichas zonas, la vacunación de protección de emergencia en un radio de 3 km fue más eficaz que en un radio de 1 y 10 km.

## **MEDIDAS DE HIGIENE GENERAL**

Deben ser implementadas en las explotaciones intensivas de animales. Los trabajadores deberían usar mascarilla, trajes de uso exclusivo, incluyendo calzado, gafas de protección; además deben realizarse desinfección de útiles y utensilios, comederos, bebederos, jaulas y alojamientos, patios si los hubiera, e impedir el acceso de animales silvestres.

Debe haber un programa de Desinfección, Desratización y de Desinsectación en todas las explotaciones ganaderas intensivas y semiintensivas.

## **MONITORIZACIÓN:**

La complementación de medidas de vigilancia y prevención y la monitorización de la eficacia de las vacunas, constituyen los más efectivos sistemas de lucha contra la influenza en explotaciones avícolas. (EFSA, 2023). Es preciso instaurar un sistema de vigilancia y exploración clínica de animales; en base al consumo de pienso, disminución de la producción, bajo índice de transformación. Todos los cadáveres deben ser examinados por necropsia, a la búsqueda de lesiones compatibles con influenza; recurriendo si es preciso a la histopatología. Deben realizarse controles laboratoriales, al menos por ELISA; y en caso de enzootia, epizootia o simplemente brote, proceder investigación microbiológica de IVs en los cadáveres y heces y/o exudado nasal ú orofaríngeo.

## **PROFILAXIS PROSPECTIVA**

Ya que las mutaciones I68T y L69P en la PB1-F2 del A/H1N1/1918 inducen una degradación proteosómica activa dependiente de la ubiquitina, que se corresponde con una patogenicidad severa (Liu et al., 2015), el seguimiento de las mutaciones de PB1-F2 podría contribuir a predecir el próximo virus altamente patógeno que se convertirá en una pandemia global en el futuro. (PARP -poliADP poliRibosa Polimerasa)<sup>68</sup>.

La Investigación de heces de aves salvajes permitirá conocer los IVs que portan y en consecuencia valorar los riesgos que entrañan, tanto para la cabaña ganadera como para la Salud Pública.

De cara a la Salud Pública y a la Sanidad Animal, hay que tener en cuenta. Que el virus de la gripe A, independientemente de la cepa, puede permanecer estable en leche sometida a temperaturas de pasteurización.

## **TERAPÉUTICA**

**Dianas Terapéuticas:** Los factores del huésped que son esenciales para el crecimiento vírico, con lo que suponen posibles objetivos farmacológicos. Además son cruciales para comprender el mecanismo de la infección vírica (Su et al., 2013). Obviamente también tienen un gran interés en epidemiología prospectiva.

- La alteración del sitio de unión de la PB2 a la caperuza consigue frenar la reproducción del virus influenza (Guilligay et al., 2008). Por lo que fármacos que consigan producir esta alteración impedirían la diseminación tisular del IV. Caso del Primodivir (VX-787) (Sun et al., 2023).
- Silenciamiento génico postranscripcional, mediante síntesis in vitro de ARN de interferencia.
- Canal iónico M2: su función es permitir la entrada de protones al interior del IV, con lo que se

68.- Enzima que participa en muchas funciones celulares, incluyendo la reparación del ADN. También se llama PARP y poli-adenosina-difosfato-ribosa-polimerasa.

disocian las proteínas unidas al genoma vírico, que queda liberado. Amantidina y rimantidina bloquean este canal iónico.

- Inhibición de las vías de oxidación intracelular. La N-acetyl-L-cysteine (NAC) ha demostrado su capacidad en la inhibición de la replicación de los IVs estacionales humanos (que también afectan a porcinos). Se estudió su efecto sobre la respuesta inflamatoria inducida por los IVs, sobre la replicación del virus (en cultivos celulares) y la apoptosis inducida por el IV H5N1 sobre las células epiteliales del aparato respiratorio. Se observó la NAC reduce el efecto citopático debido a la infección celular por H5N1 y la apoptosis inducida por el virus 24 h después de la infección. NAC también disminuyó la producción de citoquinas e interleucinas proinflamatorias (CXCL8, CXCL10, CCL5 e IL-6) en cultivos celulares infectados con H5N1; en estos cultivos también se observó la reducción de la “migración” de monocitos hacia el sobrenadante del cultivo celular. Los mecanismos antivirales y antiinflamatorios de la NAC incluyen la inhibición de la activación de vías productoras de moléculas oxidantes, incluido el factor de transcripción NF-κB y la proteína cinasa activada por mitógenos p38 (Geilar et al., 2010). Los inhibidores farmacológicos de NF-κB (BAY 11-7085)<sup>69</sup> y de p38 (SB203580)<sup>70</sup> ejercen efectos similares a los hallados de la NAC en células infectadas por H5N1. La combinación de BAY 11-7085 y SB203580 incrementa los efectos inhibidores de la replicación del virus e inhibe la producción de moléculas proinflamatorias en relación con cualquiera de los tratamientos por separado. La NAC inhibe la replicación del H5N1 y la producción de moléculas proinflamatorias inducida por el H5N1. Por lo tanto, los antioxidantes como la NAC representan una posible opción de tratamiento adicional frente a IVs A (Geilar et al., 2010).
- La oxidasa endosómica NOX2<sup>71</sup> induce la inflamación pulmonar durante la infección por IV A. Otro inhibidor de estrés oxidativo celular, el gp91dsTAT conjugado con colestanol (Cgp91ds-TAT) inhibe la oxidasa endosómica NOX2 (To et al., 2017); con lo que atenúa la inflamación de las vías respiratorias y la replicación vírica en infecciones con una cepa de IV A de baja patogenicidad (To et al., 2019).
- NOX2 inhibida con apocinina, ó con el péptido bioactivo gp91ds-TAT (To et al., 2017). La utilización de inhibidores de la NOX2, combinados con otras medidas terapéuticas antivíricas, constituyen una forma efectiva de control de influenzavirus, reduciendo la morbilidad y la mortalidad (To et al., 2020). Sin embargo, otros estudios concluyen que NOX2 puede regular el nivel de expresión de la proteína mitocondrial de señalización antivírica, MAVS, e inducir la activación de IRF-3 mediada por RIG-I y la expresión de genes antivirales de pendientes de interferón (IFN-β), implicados en la defensa antiviral del huésped (Soucy-Faulkner et al., 2010). Con lo que esta estrategia podría ser útil solo con virus de alta patogenicidad que necesitan de un medio ambiente oxidativo.
- La molécula antioxidante NAC<sup>72</sup> inhibe la replicación de los IV A H3N2, H5N1 y en menor medida H1N1 (Graham et al, 2007; Mata et al., 2011) e influenzavirus B (Mata et al., 2011).
- La administración localizada de inhibidores de la NOX2 es una posible estrategia terapéutica contra el IAV, que tiene el potencial de limitar la patogénesis.

69.- Es un inhibidor de la activación de NF-κB y de la fosforilación de IκBα (estabiliza IκBα en el citoplasma).

70.- Adezmapimod es un inhibidor selectivo y competitivo con ATP de la proteína kinasa activada por mitógenos p38. Adezmapimod y es un activador de la autofagia y la mitofagia.

71.- Proteína NOX2 (NADPH oxidasa 2). Es una enzima generadora de superóxido que forma especies reactivas de oxígeno

72.- N-Acetil-Cisteína.

- La sobreexpresión en suinos de la proteína 3 transmembrana inducida por interferón (IFITM3) produce un descenso de la inflamación, interviniendo en la vía señalización TLR4 y en la producción de IFN de tipo 1 (Li et al., 2017; Jinfang et al., 2014).
- -Sulforano y galato de epigallocatequina, reducen la carga vírica de algunos IVs A/H3N2, mediante la inducción de la activación de NRF2<sup>73</sup>.

**Inmunoterapia:** Kanekiyo et al. (2025) demuestran que la profilaxis previa a la exposición con el anticuerpo ampliamente neutralizante (bnAb) MEDI8852<sup>74</sup> es muy eficaz para proteger a los macacos cynomolgus (macaco cangrejero -*Macaca fascicularis*) de la enfermedad grave causada por la infección por aerosol con el influenzavirus H5N1 de la gripe aviar altamente patógena. La protección es dependiente de la dosis de anticuerpo pero independiente de las funciones efectoras mediadas por Fc a la dosis probada. Los macacos que recibieron MEDI8852 a dosis iguales o superiores a 10 miligramos por kilogramo p.v. presentaron un deterioro insignificante de la función respiratoria tras la infección, mientras que los animales de control no estaban protegidos frente a la enfermedad grave y la mortalidad. Con lo que MEDI8852 y otros bnAbs, es posible conseguir protección frente a influenzavirus A pandémicos. (Kanekiyo et al., 2025).

**Empleo de Vectores Plasmídicos:** el tratamiento de células de trucha arcoíris con el vector plasmídico que codifica IFIT5 confiere protección a las células frente a la infección por el virus de la septicemia vírica hemorrágica (VHSV), por lo que esta tecnología se propone como un terapéutico antiviral (Ortega-Villazán et al., 2020).

**Ingeniería Genética:** Es previsible que la manipulación de la maquinaria de la ubiquitina con fines terapéuticos altere la función de múltiples proteínas víricas en distintas fases del curso de la infección (Kirui et al., 2016).

## ● VACUNAS:

**Pecado antigénico original:** El repertorio de anticuerpos específicos de la gripe se modifica continuamente con la infección y la vacunación. Este concepto se refiere a que la memoria inmune del animal, siempre va a primar la producción de anticuerpos correspondientes al primer contacto, sea vacunal o debido a infección natural, con ocasión de contactos posteriores con IVs, y que debido al alto grado de mutación de los IVs, lo más probable es que sean distintos a los del primer contacto; es decir, los individuos tienden a reutilizar las células B de memoria de la exposición previa para generar anticuerpos contra nuevas variantes. La consecuencia es recuperar células B de memoria (MBC) contra epítomos variables en constante evolución, que corresponden a antígenos no protectores, en lugar de inducir la transformación a células plasmáticas que elaboren anticuerpos contra epítomos ampliamente neutralizantes de la hemaglutinina. Este fenómeno se considera responsable de los fracasos de la vacunación (Skowronski et al., 2017). Idealmente una vacuna efectiva debería dirigirse contra epítomos conservados de la HA y superar con ello la acción debida a los anticuerpos séricos preexis-

73.- Factor nuclear tipo eritroide 2. Es un factor de transcripción maestro para la defensa celular contra el estrés endógeno y exógeno, al regular la expresión de muchos genes antioxidantes y de desintoxicación.

74.- Anticuerpo monoclonal IgG1 humano que se une a un epítomo altamente conservado del tallo de la hemaglutinina de la gripe A.

tentes contra epítomos tanto conservados como variables de la HA (Guthmiller et al., 2021; Wong et al., 2017; Wu et al., 2012; Skowronski et al., 2017; Lewnard et al., 2018; Monto et al., 2017). No obstante, en hurón se ha investigado la presencia de anticuerpos inhibidores de la hemaglutinación, inducida por repetidas exposiciones a IV A/H3, los cuales a su vez pueden haber ido sufriendo deslizamientos. Einav et al., en 2023, demuestran que, a pesar de la inducción inmune debida al primer contacto, las exposiciones repetidas inducen anticuerpos ampliamente neutralizantes. Lo que refuerza la hipótesis de que con cada infección adicional, los anticuerpos se reenfojan en epítomos conservados o regiones estructurales a través de diferentes cepas de infección.

La inmunidad humoral contra los IV A está limitada por la incapacidad del sistema inmunológico del huésped para inducir y mantener respuestas de anticuerpos contra epítomos protectores conservados. Los anticuerpos neutralizantes contra epítomos conservados de HA son los más protectores, pero los que menos se inducen. Múltiples factores limitan la inducción de anticuerpos ampliamente neutralizantes (bnAbs). Los LB reaccionantes a epítomos conservados tienen un repertorio restringido frente a ellos y a menudo son polirreactivos, las células B vírgenes contra estos epítomos son limitadas. Las células B memoria (MBC) correspondientes a epítomos conservados deben competir con las células B específicas de la cepa por el antígeno. Como los MBC contra epítomos conservados tienden a tener una afinidad más fuerte por las cepas pasadas (las que las generaron), es probable que los MBCs específicos de la cepa vacunal queden en inferioridad respecto a los MBC específicos para los epítomos conservados de la cepa que produjo la primera infección. Además, los anticuerpos séricos preexistentes pueden conducir a la rápida eliminación de antígenos y epítomos conservados enmascarados por la combinación con los anticuerpos preexistentes, limitando la activación y una mayor maduración de afinidad de los MBC contra epítomos conservados. Del mismo modo, la retroalimentación de anticuerpos puede limitar las respuestas de GpC<sup>75</sup> y limitar las respuestas de bnAb. Por último, las células B dirigidas a epítomos conservados están en desventaja de avidez, ya que muchos epítomos conservados son difíciles de alcanzar (Guthmiller et al., 2021).

Un enfoque universal de una vacuna contra la influenza implica mejorar la inmunidad heterosubtípica mediada por células T a los epítomos conservados. Aunque la presencia de células T de reacción cruzada parece ser protectora, subsiste el problema de la liberación de citocinas elaboradas por los LT, especialmente en su papel en la patología pulmonar.

Obviamente no todas las células B naïve se activan frente a todos los antígenos del IV con los que tienen contacto. Hay células B con distintas afinidades por distintos antígenos y también dependen de la disponibilidad de linfocitos TH2 que puedan ayudar a su activación. En animales vacunados la exposición a IV deberá provocar una mayor respuesta de células B a los antígenos HA, puesto que estos son piezas fundamentales en la elaboración de vacunas. En general las vacunas inactivadas inducen pobres respuestas de anticuerpos contra HA, por lo que se necesitarían muchas revacunaciones para inducirlos; lo que resulta difícil en mamíferos de renta y prácticamente imposible en galliformes. La infección natural lógicamente pondrá en contacto más cantidad de los distintos antígenos del IV con células B inactivas, pero que como es previsible solo reconocerán los antígenos con los que han estado en contacto, y no los que sean diferentes cuando se infecten por un IV que no los contenga. En animales de compañía o en équidos que pueden haberse infectado en los primeros meses de vida y que eventualmente se reinfectan a lo largo de su vida, la primera infección generará en ellos una memoria más larga, pero para un espectro vírico más estrecho, sobre todo si las primeras exposiciones provienen de vacunaciones.

---

75.- Regiones donde existe una gran concentración de pares de citocina y guanina enlazados por fosfatos.

## Anticuerpos Policlonales:

En el caso de infección humana por IV A/H1N1 la focalización inmunitaria contra un determinado epítipo de la HA1, dificulta la unión de anticuerpos policlonales a otras partes de la proteína HA1 (Li et al., 2013; Linderman et al., 2014; Huang et al., 2015; Davis et al., 2018). Estudios con espectrometría de masas demuestran que los anticuerpos que se unen a la HA, tras la vacunación suelen estar dominados por relativamente pocos clonotipos<sup>76</sup>, y estudios con sueros de hurones muestran que las mutaciones de un pequeño número de residuos de HA cerca del dominio de unión al receptor pueden provocar grandes cambios antigénicos (Lee et al., 2017, 19; Koel et al., 2013). En todo caso, la forma en que la inmunidad policlonal ejerce la selección sobre el virus de la gripe puede depender del suero en cuestión.

La variación individual en la especificidad de la inmunidad antigripal puede desempeñar un papel importante en la evolución del virus y la susceptibilidad a la enfermedad.

## Anticuerpos séricos preexistentes y enmascaramiento de epítopos

Como los humanos están expuestos regularmente a los IVs A, tienen anticuerpos séricos contra una amplia gama de antígenos y epítopos de IV A, que pueden limitar la cantidad y especificidad de los MBCs recuperados tras la exposición al virus. En los suinos la interferencia proviene principalmente de la inmunidad conferida a los lechones por parte de la madre, mediante los calostros y los anticuerpos generados por contacto, ya que los neonatos no son inmunocompetentes hasta las 4 semanas (Martínez et al., 2023). A mayores títulos de anticuerpos preexistentes menor seroconversión post-vacunal (Sasaki et al., 2008), debido a la reducción de la activación de MBCs y las respuestas de PB (Sasaki et al., 2008; Andrews et al., 2015). A medida que la activación de las células B se reduce por los altos títulos de anticuerpos preexistentes, los MBC y las células B no activadas tienen menos probabilidades de ser reclutados en los GC para someterse a la maduración de afinidad. Lo que provoca una menor respuesta inmune contra la cepa vacunal. Concordantemente, la maduración de afinidad de novo se reduce en individuos que se vacunan repetidamente (Khurana et al., 2019). Los anticuerpos preexistentes podrían reducir la activación de las células B después de la exposición al IV A por diversos mecanismos: eliminación rápida del antígeno, formación de complejos inmunes, retroalimentación de anticuerpos y enmascaramiento de epítopos.

Los anticuerpos séricos preexistentes pueden *eliminar los antígenos* víricos, impidiendo la activación de los MBCs y las nuevas células B naive. También pueden *formar complejos inmunes* con antígenos víricos que pueden desregular las pocas células B activadas tras la exposición al IV A. En la *retroalimentación de anticuerpos* las células dendríticas foliculares de la zona de luz de los Centros Germinales adquieren antígeno a partir de complejos inmunes, y pueden afinar las respuestas en los GC mediante la selección competitiva de clones en los grupos de Células Plasmáticas de Larga Vida (LLPC) y de Células B Memoria MBC (Allen et al., 2008); la selección de LB en los CG implica la captura del antígeno por las células B desde las células dendríticas foliculares y presentarlo a los linfocitos Tfh<sup>77</sup>; para ello los LBs deben competir con otros LB de los GCs con distintas afinidades y con los anticuerpos preexistentes en los complejos inmunes, solo así los LBs de los GCs pueden adquirir antígeno y competir con éxito por las células Tfh dentro del GC (Zhang et al., 2013). Con todo esto, solo se seleccionan

76.- Secuencia de nucleótidos única de reordenamiento del gen receptor de antígeno correspondiente a una población de células idénticas.

77.- Grupo especializado de linfocitos T auxiliares (CD4+) presentes en folículos linfoides. Juegan un papel importante en la inmunidad protectora ayudando a las células B a producir anticuerpos.

unos pocos de clones de LBs de alta afinidad. No obstante, los antígenos HA, inducen la selección de LBs de afinidades variables, para formar MBCs (Kuraoka et al., 2016; Tas et al., 2016), aunque los MBCs de baja afinidad es difícil que participen en la maduración, en los GCs secundarios (Viant et al., 2020; Mesin et al., 2020); y los MBCs que se activan son los clones de alta afinidad (Wrammert et al., 2008; Dugan et al., 2020). El refuerzo con antígenos variantes también aumenta la unión al antígeno recaptado en los GC; en definitiva, la retroalimentación de anticuerpos dirige a los linfocitos B recuperados de los GC hacia epítomos variantes (Herb et Curotto de Lafaille, 2024).

Los clones de MBCs específicos de epítomos que se activan tras el contacto con IV A pueden, al menos en parte, estar determinados por los niveles de anticuerpos séricos preexistentes que pueden unirse a un epítomo concreto, un fenómeno conocido como *enmascaramiento del epítomo*. Los anticuerpos que se unen a un epítomo específico pueden limitar la inducción de más anticuerpos contra el mismo epítomo, pero no contra otros epítomos (McNamara et al., 2020; Berstrom et al., 2017; Zarnitsyna et al., 2015), por lo que el enmascaramiento de epítomos puede conducir a la diversificación de la respuesta inmune humoral contra múltiples epítomos, en lugar de recuperar MBC contra los mismos epítomos (Guthmiller et al., 2021). Si la distancia antigénica entre los virus a los que el individuo ha estado expuesto previamente y el IV A del contacto actual es grande, entonces tendrá pocos anticuerpos séricos preexistentes contra la mayoría de los epítomos de HA, incluido el dominio del tallo de HA, y puede que no posea MBC contra epítomos variables de la cabeza de HA, con lo que se pueden activar MBCs dirigidos a epítomos que induzcan protección de los dominios conservados de cabeza y tallo de HA, y pueden reclutar LBs naives contra epítomos variables de la cabeza HA (Andrews et al., 2015, 17).

Así quedarán títulos moderados contra epítomos de HA conservados y niveles relativamente bajos de anticuerpos contra los sitios antigénicos variables. Tras la exposición posterior al mismo IV A o a uno similar, los MBC contra los epítomos variables pueden ser activados por exposición secundaria, mientras que los epítomos conservados están enmascarados por anticuerpos preexistentes, limitando la recuperación de MBC contra esos epítomos. Como los títulos de anticuerpos preexistentes son ahora altos contra todos los epítomos, la recuperación de MBCs se reducirá significativamente en exposiciones posteriores al mismo IV o a un virus similar, lo que lleva a la reducción del fenotipo de respuesta de plasmoblastos (PB) observado en cohortes de vacunación repetida (Sasaki et al., 2008).

Los bajos anticuerpos séricos preexistentes contra el dominio del tallo de HA pueden suprimir la activación de los MBC generados contra los epítomos del dominio del tallo (Nachbagauer et al., 2021; Turner et al., 2020). McNamara et al (2020) demuestran que niveles no protectores de anticuerpos preexistentes limitan la activación de células B. Por lo tanto, los niveles no protectores de anticuerpos anti-HA podrían limitar la activación de los LBs, así como dificultarían la maduración adecuada de la afinidad contra variantes derivadas y las respuestas protectoras de anticuerpos contra los IV A (Guthmiller et al., 2021).

En todo caso los anticuerpos anti IV A disminuyen con el tiempo; así las células plasmáticas de larga vida inducidas por la vacunación no adquieren el perfil metabólico y transcripcional necesario, la mediación del receptor de inhibición mediada por anticuerpos para IgG (FcγRIIβ), puede producir apoptosis en ellas (Xiang et al., 2007).

## **Consideraciones Generales en el Diseño de Vacunas**

La vacunación debe tener el potencial de volver a entrenar profilácticamente a los MBC y reclutar células B ingenuas contra nuevos epítomos para proporcionar una potente protección contra virus antigénicamente nuevos, como los observados durante las pandemias de IAV.

Es preciso superar los obstáculos inmunológicos procedentes de la distinta activación y generación de clones de linfocitos B, de la generación de plasmoblastos y de la activación y generación de células B memoria, a partir de las vacunas, generando anticuerpos que puedan impedir la adhesión

de la hemaglutinina de la superficie del influenzavirus a los receptores de las células epiteliales; también deben generar anticuerpos que impidan la acción de la neuraminidasa, de modo que el virión no pueda liberarse de la célula. Esto es especialmente importante, además de en humanos, en suinos que pueden tener anticuerpos interferentes. No menos importante es generar anticuerpos y MBCs contra proteínas internas, en animales de larga vida (caballos y animales de compañía); estas NP, M1 están generalmente más conservadas y pueden ser compartidas por diferentes virus, con motivo de la recombinación genética.

Idealmente una vacuna debería bloquear la NS1.

### *Elusión de epítomos variables de HA*

Por lo general las vacunas inducen anticuerpos neutralizantes contra la cabeza globular inmunodominante de la HA, que son específicos de los bucles altamente variables que rodean el sitio de unión al receptor. Pero los anticuerpos neutralizantes contra las regiones del tallo de la HA, altamente conservadas, proporcionan una protección completa contra la infección homóloga e intrasubtipo del virus de la gripe en ratones (Berry et al., 2017). Idealmente una vacuna antiinfluenza debe actuar contra los epítomos conservados de la HA y no los variables, evitando así que se activen las células memorias contra estos últimos, que posiblemente podrían no estar presentes entre los epítomos de la HA de los IVs infectantes del animal vacunado. Así el desarrollo de vacunas mini-HA<sup>78</sup> (Impagliazzo et al., 2015; Yassine et al., 2015) en primates no humanos mostró la inducción robusta de anticuerpos protectores contra el tallo de HA (Darricarrere et al., 2021; van der Lubbe et al., 2018). En humanos se han ensayado vacunas a base de quimeras que sustituyen el dominio principal del tallo por el correspondiente de un IV aviar (Krammer et al., 2013), pero manteniendo el dominio del tallo de los virus H1 o H3 estacionales; aprovechando la circunstancia de que en nuestra especie existe poca inmunidad preexistente a los dominios variables de los IVs aviares, es de esperar que se recuperen preferentemente los MBC contra los epítomos conservados en el tallo HA de los IVs estacionales humanos H1 y H3 (Bernstein et al., 2020). Naturalmente la presión vacunal implica mutación de los genes que codifican para las proteínas antigénicas de los IVs, especialmente para la HA. Para obviar esto Weidenbacher et al. (2019) enmascaran los epítomos variables con glicanos, lo que además obligaría a los anticuerpos a dirigirse contra los epítomos conservados, al no detectar a los variables. Otra alternativa utilizada en humanos mayores de 65 es utilizar vacunas que contienen hasta 4 veces más HA que las que se utilizan en adultos; con lo que al aumentar la cantidad de antígeno, los anticuerpos preexistentes no podrán secuestrar todos los antígenos presentes dentro de la dosis vacunal, lo que permitirá que el antígeno libre facilite la activación de MBCs, (DiazGranados et al., 2014) y por lo tanto, promueva la seroconversión contra los epítomos de HA inductores de protección. Sin embargo, las vacunas de dosis altas siguen impulsando las respuestas de anticuerpos contra la cabeza de la HA, lo que limita la efectividad de los anticuerpos ampliamente neutralizantes (bnAbs) (DiazGranados et al., 2014). Los adyuvantes de aceite en agua incrementan la respuesta de anticuerpos de reacción cruzada, ya que la emulsión protege a los antígenos vacunales de ser secuestrados por anticuerpos séricos preexistentes, permitiéndoles llegar intactos a los ganglios linfáticos (Cantisani et al., 2015; Liang et al., 2017).

Los antígenos unidos a membrana inducen agrupación de los BCRs, lo que incrementa la inmunogenicidad, ya que así reciben una señal de activación más fuerte (Guthmiller et al., 2020). Para inducir este aumento de señalización de BCRs, se ensayan vacunas a base de nanopartículas que portan diversos antígenos HA en los que los HA adyacentes son heterotípicas y antigénicamente distintas,

---

78.- Utilizan solo la región del tallo de la HA, no la cabeza.

pero que se agruparán en la membrana induciendo la agrupación de BCRs y consecuentemente aumentando la inmunorrespuesta de LBs (Kanekiyo et al., 2019; Boyoglu-Barnum et al., 2021).

Si bien el uso de nanopartículas heterotípicas limita la capacidad de las células B específicas de la cepa para entrecruzar múltiples BCRs mediante múltiples HAs, a la vez confiere una ventaja a las células B dirigidas a epítomos conservados, los cuales sí son capaces de entrecruzar múltiples BCRs a través de HAs heterotípicas adyacentes. Y nanopartículas que solo poseen la porción del tallo también pueden promover el entrecruzamiento de BCRs, con lo que inducirían respuestas de los LBs contra el tallo de la HA (Darricarrere et al., 2021).

Las vacunas también deben optimizarse para promover la selección de células B, dentro del GC, dirigidas a epítomos conservados. Una posibilidad es el uso de estrategias de vacunación iterativas, donde las inmunizaciones secuenciales entregan continuamente antígenos a los GC. Como las células B dirigidas a epítomos conservados pueden tener una desventaja de afinidad, aumentar la cantidad de antígeno disponible mediante inmunizaciones secuenciales puede permitir la selección permisiva de células B al reducir la competencia basada en la afinidad por el antígeno. En particular, se ha demostrado que las inmunizaciones secuenciales con HA aumentan las respuestas de bnAb (Luo et al., 2018; Liu et al., 2019). Alternativamente, podrían emplearse vectores, adenovirus, que liberen lentamente el antígeno (Matsuda et al., 2021) y las vacunas con parche de microaguja (Boopathy et al., 2019), con las que se logra experimentalmente impulsar la maduración de las LB de GC para que expresen bnAbs.

### *Generación de Respuesta Celular:*

Una vacuna exitosa debería ser capaz de inducir una fuerte respuesta inmune de las células T CD8+. Generalmente, las vacunas compuestas por los patógenos vivos atenuados pueden generar respuestas inmunes mediadas por células T CD8+ (Akondi et al., 2009; Sei et al., 2015). La actividad antiviral de las células NKT es evidente por el hecho de que los ratones con deficiencia de células NKT mostraron una mayor susceptibilidad a los virus (Kok et al., 2011; Kulkarni et al., 2010). Dado que las células NKT tienen una capacidad para estimular las respuestas inmunitarias innatas y adaptativas y el quitosano estimula la respuesta de aquellas puede resultar ser un inmunoadyuvante eficaz en el desarrollo de una vacuna exitosa (Khan et Khan 2021).

En animales mamíferos con una protección inmunológica fuerte, inducida por una vacuna, por una infección previa o por anticuerpos maternos, el daño tisular causado por la infección del virus del IV A puede verse reducido. Esto ocurre cuando los anticuerpos producidos por la exposición son suficientemente similares al virus causante de la infección. Un emparejamiento antigénico perfecto es ideal, ya que permite muy poca, o ninguna, replicación del virus, excreción o signos clínicos. No obstante, si el virus es lo suficientemente similar para causar una reacción cruzada, la infección puede verse reducida a unos 2-4 días (3TRES3, 2015).

Existe una necesidad urgente de desarrollar vacunas que puedan proteger tanto contra las cepas de gripe actuales como contra las futuras. En este sentido, Jiang et al., (2017) ensayan una vacuna en ratones que provoca amplias respuestas de anticuerpos neutralizantes y de células T que confirieren una amplia protección contra diversos IVs en ratones (Berry et al., 2017; Jiang et al., 2017).

### *Valoración de vacunas:*

*Pruebas de Inhibición de la Hemaglutinación:* Los resultados de las pruebas de IH pueden indicarnos si los anticuerpos desarrollados tras la vacunación (o infección) con un influenzavirus pueden reconocer y unirse a otros influenzavirus, lo que significa que estos otros virus son similares al virus de la vacuna.

*Determinación de la persistencia de células Memoria:* la proporción de células B de memoria en circulación no se correlaciona exactamente con los títulos de anticuerpos para muchos antígenos (Amanna et al., 2007). Los estudios en primates no humanos también sugieren que las células plasmáticas pueden persistir durante un periodo de tiempo prolongado en ausencia de división celular, y en ausencia de células B de memoria (Hammarlund et al., 2017).

En felinos ninguna vacuna proporciona una protección completa, pero merece la pena vacunar a los gatos de compañía, ya que es la mejor medida preventiva. También puede ayudar a reducir los síntomas, incluso si están infectados. También es importante saber que incluso los gatos vacunados pueden convertirse en portadores e infectar a otros gatos, o personas, sin mostrar ningún síntoma. La vacuna no puede prevenir los síntomas si el animal ya tiene gripe felina (Bluecross.org.UK).

### **Vacunas de Nanopartículas:**

El desarrollo de formulaciones basadas en nanotecnología ha demostrado ser muy prometedor para el desarrollo de vacunas de nueva generación, mejoran la estabilidad de la vacuna y aumentan la inmunogenicidad de los antígenos encapsulados. Su efectividad varía con la forma, el tamaño y las propiedades del vehículo de administración. Se utilizan nanopartículas de oro y plata, liposomas y nanopartículas de quitosano<sup>79</sup>, que tienen la capacidad de inducir las respuestas de células T específicas del antígeno y las respuestas de anticuerpos (Fifis et al., 2004). Los principales nanoportadores de vacunas incluyen liposomas, nanopartículas inorgánicas, nanopartículas de quitosano, nanopartículas PLGA<sup>80</sup> y partículas similares a virus (VLP) (Khan et Khan, 2021; Sied et al., 2003; Ahmad et al., 2001).

### *Escape del IV de las vacunas por Mutación*

Las modificaciones post transduccionales (PTMs) inducidas por la ubiquitinación de PB1-F2 son cruciales para el control de la actividad de la polimerasa vírica (Marques et al, 2019; Kosik et al., 2015). La pérdida de la ubiquitinación de PB1-F2 (por mutación en el dominio C-terminal de lisina por arginina, en la cepa laboratorial PR8), determina un incremento de la PB1-F2 en el núcleo y de la actividad de la polimerasa, así como del antagonismo al IFN- $\beta$  y las respuestas de anticuerpos más altas tras la vacunación, mientras que el virus salvaje mostró una reacción de anticuerpos débil (Kosik et al., 2015).

Con lo que es posible seleccionar fuertes mutantes de escape incluso a partir de suero extraído después de que el virus Perth/2009 circulara en individuos vacunados con un derivado antigénico de este virus. En algunos casos, la vacunación desplaza la especificidad del suero, mientras que en otros casos potencia principalmente las especificidades (Fonville et al., 2014; Lee et al., 2016; Lee et al., 2019; Henry et al., 2019). Las mutaciones de escape fuertes se encuentran predominantemente, pero no exclusivamente, en antígenos de la cabeza globular de HA, aunque sus efectos inmunes varían (Lee et al., 2019).

### **Vacunas en Cerdos**

Los virus de la gripe suina infectan naturalmente a los cerdos y pueden transmitirse a los humanos. Los cerdos se infectan de virus humanos, aviáres y naturalmente porcinos, constituyen un vaso de mezcla, de modo que en ellos se producen reagrupamientos genéticos entre virus procedentes de distintas especies de aves, de humanos y de suinos, que generan nuevos virus influenza, que pueden

79.- Biopolímero de aminopolisacáridos.

80.- Copolímero de ácido láctico y glicólico.

infectar a humanos y a otros cerdos. Por lo que sería deseable contar con una vacuna anti-influenza porcina que induzca protección por inmunidad cruzada entre diferentes IVs y subtipos de estos, que circulan en cerdos (Richt et al., 2006). Se han ensayado vacunas que incluyen un seudogen para la proteína no estructural NS1<sup>81</sup> (A/swine/Texas/4199-2/98), de forma que produce una proteína incompleta respecto a la del virus salvaje H3N2 (Richt et al., 2006; Vandoorn et al., 2022); aunque induce anticuerpos neutralizantes contra el virus homólogo en el suero y en menor medida en la nariz y los pulmones, no se detectaron títulos significativos de anticuerpos de reacción cruzada contra los swIV A heterólogos. Por lo tanto, la protección cruzada parcial probablemente se base en respuestas inmunes celulares y mucosas contra partes conservadas de las proteínas swIV A (Vandoorn et al., 2022).

En Cerdos, la débil inmunidad mucosa en vías respiratorias inducida por la vacuna, puede ser solventada mediante la activación de células NKT invariantes, mediante  $\alpha$ -Galactosilceramida como adyuvante en vacuna frente al virus suino H1N1 inactivado, administrada por vía intranasal (Dwivedi et al., 2016). En su experimento Dwivedi y colaboradores, observan un notable incremento de IgA específica frente al IV a/H1N1, la secreción de IFN- $\alpha$  y la citotoxicidad celular NK. Además, la estimulación celular de iNKT mejoró la secreción de citocinas Th1 (IFN- $\gamma$  e IL-12) y redujo la producción de citocinas inmunosupresoras (IL-10 y TGF- $\beta$ ) en los pulmones de cerdos.

Vacunas disponibles para cerdos portan los IV suinos Bakum/IDT1769/2003 (H3N2) Haselünne/IDT2617/2003 (H1N1) Bakum/1832/2000 (H1N2).

Vacunas antiinfluenza en vehículos de nanopartículas se han ensayado en porcinos: La proteína de membrana M2 del virus de la gripe inmovilizada en nanopartículas de oro indujo inmunidad protectora contra los subtipos de influenza A (Tao et al., 2015). Utilizando Nanopartículas a base de quitosano (polímero biodegradable) se ha conseguido mejorar la inmunogenicidad de la vacuna contra el virus de la gripe. Las nanopartículas de PLGA (poli(ácido láctico-co-glicólico) incrementan la proliferación de linfocitos específicos del antígeno contra los antígenos H1N2 (Dhakal et al., 2017).

El continuo contagio de cerdos por influenzavirus humanos, ha obligado al empleo de autovacunas (van Reeth et Ma, 2013; Nelson et al., 2015; Tapia et al., 2018, 24).

### Recomendaciones CDC (2024)

- Usar las medidas de bioseguridad adecuadas
- Utilizar procedimientos de cría de cerdos con el sistema “todo dentro – todo fuera” y limitar el traslado de cerdos entre los corrales, los establos y las granjas
- Mantener limpios los establos, la comida y los depósitos de agua
- Vacunar a los criadores de cerdos contra la influenza estacional cada año
- Usar sistemas de ventilación adecuados en espacios cerrados como establos de cerdos
- En muestras, ferias o exposiciones agrícolas en las que hay muchos cerdos, el hecho de reducir el tiempo que los cerdos están en la feria o en la exposición puede reducir la transmisión de la influenza entre los cerdos y entre cerdos y personas.
- Vacunar a toda la piara con vacunas contra la influenza porcina.

Las vacunas contra la influenza para cerdos pueden ayudar a reducir el riesgo de infección por el virus de la influenza porcina, pero puede que no sea efectiva al 100%. A veces, es posible que las vacunas contra la influenza utilizadas en cerdos no protejan contra el virus o los virus que se propagan entre los cerdos, porque el virus de la vacuna debe coincidir con el virus de influenza A que circula entre los cerdos.

---

81.- Puesto que la NS1 inhibe el sistema del IFN.

## Vacunas en Aves

La efectividad de una vacuna depende de la similitud antigénica del virus vacunal con la del influenzavirus infectante, de la concentración de antígeno en la vacuna y de la calidad de la emulsión aplicada (Quintana López, 2015).

### Por tanto, a la hora de formular vacunas aviares, habrá que:

- Minimizar la distancia antigénica entre las vacunas y las cepas de campo, lo que requiere actualizaciones rápidas de las vacunas para que coincidan con las cepas circulantes (EFSA, 2023). Deben diseñarse y actualizarse vacunas, cuyos antígenos coincidan con las cepas circulantes en aves.
- Generar datos armonizados sobre la eficacia de las vacunas que demuestren su capacidad para reducir la transmisión, y esta capacidad también debe evaluarse en ensayos de campo. La planificación de la vacunación requiere seleccionar el tipo de vacuna y el esquema de vacunación más adecuados. La vacunación protectora de emergencia se limita a las vacunas que no están restringidas por la especie, la edad o la inmunidad vectorial preexistente, mientras que la vacunación preventiva debe dar prioridad a la consecución de la máxima protección, especialmente para las especies más susceptibles en zonas de alto riesgo de transmisión. (EFSA, 2023)
- La primera vacunación varía hasta las 6 semanas de edad. Ya que a menudo no se dispone de datos sobre el inicio y la duración de la inmunidad en las especies.
- Las vacunas aviares deben demostrar que son capaces de eliminar o reducir la transmisión de IVs aviares.
- La efectividad de las vacunas debe ser monitorizada y complementada con otras medidas otras medidas de vigilancia y prevención

### Vacunas Aviares Autorizadas en Europa:

A partir de mayo de 2024, dos vacunas veterinarias están autorizadas en la UE para la prevención de la gripe aviar A, subtipo H5, en pollos:

- **Nobilis Influenza H5N2:** una vacuna convencional e inactivada, que potencialmente podría ayudar a abordar el riesgo de gripe aviar altamente patógena, pero actualmente se produce en cantidades limitadas.
- **Innovax ND-H5:** una vacuna vectorial donde el vector, un herpesvirus de pavo, expresa el gen de la proteína de fusión del virus de la enfermedad de Newcastle y el gen de la hemaglutinina del subtipo H5 del virus de la gripe aviar.

Otros candidatos a vacunas se encuentran en diferentes etapas de desarrollo.

Las aves de corral de granja no se vacunan de forma rutinaria contra la gripe aviar en la UE.

### Tipos de Vacunas Aviares:

**Vacunas con Virus Inactivados.** Las vacunas inactivadas y adjuvadas contra el virus aviar entero son las más comercializadas, ya que la amplificación, inactivación y adyuvante del virus es un procedimiento bien establecido.

Están constituidas por virus inactivados en aves. Logran, en las infecciones por cepas de alta patogenicidad, disminuir las lesiones evitando el fallo multiorgánico debido a la hemaglutinación intravascular y la trombosis; pero no impiden la replicación del virus en el epitelio correspondiente a la infección de entrada, debido a la ausencia de anticuerpos IgA que eviten la adhesión del IV a los

receptores de las membranas celulares epiteliales. La reacción antígeno/anticuerpo se llevará a cabo una vez liberado el virus en sangre (viremia) y su intensidad dependerá de la relación en la cantidad de cada elemento: Ag-Ac. No se desarrollará fallo orgánico múltiple en el caso de inferioridad en la cantidad de anticuerpos debido a que el proceso de hemaglutinación será leve o moderado, que además será compensado por los procesos fisiológicos de homeostasia. Es decir un ave vacunada puede sobrevivir a una infección por IV aviáres de alta patogenicidad, dando tiempo a su organismo a generar anticuerpos específicos que impedirán la adhesión y replicación posterior del IV sobre las mucosas respiratoria y digestiva, en una infección subsiguiente (EFSA, 2023), pero puede excretar virus.

**Vacunas de Subunidades.** Syvac® EH Marker se basa en la tecnología de subunidades. Una vacuna de subunidades sólo contiene partes (o «subunidades») de un virus o bacteria, en lugar de todo el microorganismo. Estas vacunas, también denominadas vacunas marcadoras, inducen una respuesta inmunitaria diferente de la inducida por la infección natural. Las vacunas marcadoras se basan en mutantes por delección en patógenos de tipo salvaje, vacunas de subunidades y vacunas de virus completos inactivados.

**Vacunas vectorizadas** también se utilizan ampliamente en el sector avícola HVT. Utilizan una versión modificada e inofensiva de un virus diferente (generalmente el Herpesvirus del pavo), como vehículo para llevar genes de influenzavirus (generalmente el de la HA).

**Vacunas con tecnología recombinante.** Parecidas a las anteriores, pero que se elaboran en laboratorio, mediante ingeniería genética, pero utilizando células distintas a las que se producirían en la naturaleza (cultivo en embrión de pollo). Permite una adaptación suave a las cepas circulantes y solo requieren información relacionada con la secuencia genética de las cepas circulantes

**Vacunas de ácidos nucleicos** se están considerando para el sector avícola: Wang et al (2025) utilizan ARNm para H5 en nanopartículas lipídicas (mRNA-LNPs).

La mayoría de las vacunas son específicas para su uso en pollos de gallina, algunas están indicadas para patos y gansos, mientras que muy pocas son específicas para pavos y patos.

Las vacunas se administran principalmente por vía subcutánea mediante inyección, con una edad de administración que varía ampliamente, pero la mayoría **se recomiendan a las 2 semanas de edad**. la inmunidad total o la inmunidad a largo plazo para diferentes tipos de producción pueden requerir más de una dosis

#### ***Indicaciones de la Vacunación antigripal de Aves:***

#### ***Estrategias Vacunales. Distintas Finalidades de Vacunas Aviáres:***

En dependencia de la situación epizootiológica: alta densidad de granjas en una zona con aparición de brotes de enfermedad; presencia de la enfermedad en aves silvestres. Según las condiciones ambientales de la zona en que se ubican las explotaciones avícolas: presencia de humedales, rutas de aves migratorias.

En estas condiciones epizootiológicas y ambientales, la EFSA (2023) recomienda acciones vacunales distintas: La EFSA (2023,24) contempla tres estrategias de vacunación (supresora de emergencia, protectora de emergencia y preventiva) con su resultado final previsto (ausencia de enfermedad, erradicación rápida o minimización de pérdidas).

- Vacunación de las aves de corral en los establecimientos afectados **para obtener una erradicación rápida**: esto llevaría a implementar una *vacunación supresora de emergencia*, que tiene como objetivo una contención breve y temporal de la enfermedad.
- Vacunación de las aves de corral en caso de que se produzca un cambio en el riesgo de infección por HPAIV **para prevenir la introducción y propagación de la enfermedad/para mantener la ausencia de la enfermedad/para evitar pérdidas económicas**: esto llevaría a la implementación de *la vacunación protectora de emergencia*
- Vacunación de las aves de corral en ausencia de un cambio en el riesgo de infección por HPAIV para prevenir la introducción y propagación de la enfermedad/para mantener la ausencia de la enfermedad/**para evitar pérdidas económicas**: esto llevaría a implementar una *vacunación preventiva*

Utilizando el modelo de transmisión-kernel, se construyeron mapas de riesgo: las áreas con alto riesgo de transmisión entre granjas se caracterizaron por granjas con un número de reproducción estimado  $R > 0.8$ .

**Inicio de la inmunidad y su duración:** Los datos sugieren 2-3 semanas tras la primera vacunación para lograr la protección, y algunas vacunas con vectores HVT (herpes virus de pavo) requirieron hasta 4 semanas.

## PROGRAMAS DE CONTROL/VACUNACIÓN:

El control y la erradicación de la HPAIV es muy difícil, ya que pueden existir diferentes dificultades para la erradicación del IV.

-baja efectividad de la vacuna para proteger plenamente a las aves vacunadas y prevenir nuevos brotes

-factores específicos del huésped que podrían provocar el fracaso de la vacuna debido a una respuesta inmunitaria pobre

-cobertura vacunal inadecuada, incapaz para detener la circulación del virus, cuando la vacuna no impide la transmisión del IV aviar

-una vigilancia ineficaz, incapaz de detectar el virus de campo en las parvadas vacunadas, dando lugar a una circulación clínicamente silenciosa de HPAIV.

### **Medidas de Control de la Vacunación:Control de la Efectividad de las Vacunas Aviares. Evaluación de las Vacunas Aviares**

Según la EFSA (2024) el control de la efectividad de poblaciones/explotaciones avícolas vacunadas debe efectuarse mediante el diagnóstico:

La selección de métodos de diagnóstico adecuados, que tengan en cuenta el tipo de vacuna utilizada es importante a la hora de aplicar un programa de vacunación contra la gripe aviar altamente patógena (IAAP) (EFSA, 2023,24). Si la vacunación es efectiva, se espera una disminución de la carga viral en las muestras utilizadas para el diagnóstico, por lo que los métodos moleculares de alta sensibilidad son la mejor opción. Aunque los métodos serológicos pueden ser razonablemente sensibles, pueden producir resultados que son difíciles de interpretar. Además de la monitorización molecular rutinaria, es recomendable el aislamiento del IV, su secuenciación genética y la caracterización fenotípica de cualquier virus de la IAAP detectado en manadas vacunadas para detectar los mutantes de escape temprano.

Tras la vacunación de urgencia, debe establecerse una vigilancia virológica de las aves muertas, de modo que pueda asegurarse la ausencia de enfermedad, o detectarse precozmente la presencia de IVs aviáres de alta patogenicidad (VPHA) en las poblaciones vacunadas. En patos, pueden efectuarse pruebas virológicas y serológicas sobre aves vivas. Además debe establecerse un perímetro de vigilancia, respecto de las explotaciones vacunadas.

Para permitir el movimiento seguro de las aves vacunadas durante la vacunación de emergencia, deben efectuarse medidas que mitiguen el riesgo: análisis microbiológicos en las 72 horas previas al movimiento y examen clínico, para detectar signos compatibles con influenza aviar. © Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria.

## **Evaluación de las Vacunas Aviáres**

La EFSA (2023,24) la calcula en base a:

- La distancia antigénica entre las cepas vacunales y las cepas circulantes. Se analizó con una metodología in-silico introducida por Peeters et al., 2017. Se hizo determinando una secuencia de consenso de HA de H5NX HPAIV (influenzavirus de alta patogenicidad) del clado 2.3.4.4b (se realizó alineando secuencias de la base de datos GISAID - *Global Initiative on Sharing All Influenza Data*). Los aminoácidos en las 27 posiciones identificadas como determinantes para la inmunidad protectora se extrajeron de secuencias de HA de virus vacunales de vacunas disponibles en bases de datos públicas. La distancia genética de la secuencia de consenso se calculó como la proporción de los residuos de aminoácidos que difieren entre los dos virus sobre el total extraído en cada uno de los 27 residuos. A continuación, se utilizó la regresión lineal para calcular los valores de distancia antigénica de las cepas vacunales con respecto a las cepas de IAAP (gripe aviar de alta patogenicidad) H5NX circulantes.
- La efectividad de una vacuna (EV) se definió como la capacidad de una vacuna para prevenir la infección en una población determinada. Este dictamen se centró en la investigación de la efectividad de una vacuna para detener la transmisión sostenida de la HPAIV en una población vacunada (EVT). Para evaluar la transmisión se utilizó el parámetro R, donde R es el número de infecciones secundarias causadas por un solo individuo infectado; por lo tanto, cuando la transmisión  $R < 1$  se desvanece, cuando  $R \geq 1$  puede producirse una transmisión extensa.  
La efectividad de las vacunas en pollos (gallinas): los resultados de EFSA sugieren que la mayoría de las vacunas evaluadas pueden reducir la transmisión de H5NX HPAIV del clado 2.3.4.4 en pollos en condiciones experimentales. Los datos sugieren una asociación entre los títulos de inhibición de la hemaglutinación (IH) y la protección contra la transmisión, especialmente en los pollos inmunizados con vacunas inactivadas. Esta relación es menos clara en los patos y no está presente en los pavos.  
Conforme los experimentos de transmisión en pollos, podría esperarse una protección completa 2 semanas después de la vacunación, pero esto se basa en los supuestos de una buena cobertura de vacunación y una buena compatibilidad antigénica. Un estudio consultado en la EFSA sugiere que la inmunidad para detener la transmisión en los pollos podría durar menos de 6 meses, mientras que en los pavos y patos la duración de la inmunidad no se ha determinado (EFSA, 2023).
- Sensibilidad elevada. La sensibilidad depende de la efectividad de la vacuna para disminuir la carga vírica. Si la vacuna tiene alta efectividad la carga vírica será baja en las aves, y por tanto en las muestras biológicas obtenidas de estos.
- Control Microbiológico. Para el seguimiento de una epizootia y para determinar la efectividad de una vacuna es necesario el aislamiento del IV aviar y su secuenciación, que nos dará información

de las posibles mutaciones que hayan ocurrido en los virus infectantes sobre las aves vacunadas y que eventualmente pueden permitir al IV aviar infectante evadir al sistema inmune activado por la vacuna.

- Investigación de ausencia de Influenza en las aves vacunadas. Mediante la investigación de la presencia de IVs de alta patogenicidad en aves muertas.
- Investigación de infección por Influenzavirus en explotaciones aviares próximas a las vacunadas. Para demostrar la ausencia de la enfermedad con > 99% de confianza y detectar la presencia de virus de la gripe aviar altamente patógena, se recomiendan realizar pruebas virológicas mensuales de todas las aves muertas hasta 15 por parvada.
- En todo caso siempre debe haber una investigación clínica y lesional (en aves muertas), a la búsqueda de signos compatibles con Influenza aviar
- Control de movimiento de Aves: Realizar inspección clínica, para comprobar la ausencia de signos compatibles con influenza en las aves. Puede recurrirse a pruebas complementarias laboratoriales, que serían precisas en caso de situaciones de presencia de influenza de alta patogenicidad en la región. La EFSA (2023, 24) recomienda para autorizar el movimiento seguro de aves de corral vacunadas la investigación de IV de Alta Patogenicidad en las aves muertas en la explotación que va a efectuar el traslado aviar.

### **ESTRATEGIA DIVA:**

Las vacunas contra la IAAP pueden reducir la enfermedad, aumentar la resistencia a la infección, limitar la excreción del virus y reducir la transmisión (Bourne et al., 2009).

Sin embargo, existe una variabilidad en la eficacia de las vacunas que depende de una serie de factores. Por lo general, las vacunas rara vez son capaces de inducir una inmunidad esterilizante prolongada, por lo que es posible que las aves vacunadas sigan infectándose con virus de tipo salvaje, pero los resultados de la infección en estas circunstancias serán atenuados y la infección será a menudo subclínica. Por lo tanto, es preciso que en cualquier programa de vacunación se despliegue un programa complementario de vigilancia o seguimiento para detectar la incursión temprana de virus de tipo salvaje, y la posible propagación críptica dentro de una población vacunada (Brown, 2022).

DIVA se corresponde con las siglas de «Diferenciación entre Animales Infectados y Vacunados»

La estrategia DIVA se basa en dos premisas:

- disponer de una vacuna eficaz contra la cepa circulante con posibilidad de diferenciar entre animales vacunados e infectados (estrategia DIVA)
- disponer de pruebas de diagnóstico capaces de detectar infecciones en animales vacunados (estrategia DIVA)

### **DIVA en AVES (OFFLU-WOAH/FAO, 2023)**

La estrategia DIVA se ha propuesto como posible solución para lograr la erradicación de la IAAP y la IABP H5/H7 sin necesidad de sacrificar aves de forma masiva y sin el consiguiente perjuicio económico que esto conlleva, además del posible desabastecimiento de productos aviares para el consumo, especialmente en países en vías de desarrollo.

Esta estrategia proporciona las ventajas de la vacunación (menos virus en el medio ambiente), pero además su capacidad intrínseca para identificar parvadas infectadas permitiría la puesta en práctica de otras medidas de control, como el sacrificio sanitario.

En las estrategias DIVA, se utilizan uno de los dos siguientes mecanismos de detección en los animales vacunados:

- 1) detección del virus de la influenza A (“DIVA virológico”), o
- 2) detección de anticuerpos contra la infección por el virus “natural” de la influenza A (“DIVA serológica”)

Para el empleo de la DIVA serológica, deben utilizarse sistemas de vacunación que faciliten la detección de la exposición al virus natural en poblaciones vacunadas. Se han utilizado varios sistemas:

- En primer lugar, utilización de vacunas que contengan un virus con el mismo subtipo de hemaglutinina (H) pero diferente neuraminidasa (N) que el virus natural. Los anticuerpos frente a la N del virus natural actúan como marcadores naturales de la infección.
- Una segunda opción de DIVA serológica es el uso de vacunas que contengan solo HA, p. ej. Vacunas recombinantes, ya sean replicantes o no, lo cual permite utilizar sistemas validados de AGID<sup>82</sup> clásico y ELISA basados en nucleoproteínas (NP) o proteínas de la matriz para detectar anticuerpos indicativos de infección en aves vacunadas.

En vacunas inactivadas se ha descrito una prueba que detecta anticuerpos contra las proteínas víricas no estructurales o M2e<sup>83</sup> (Tan et al., 2021).

### **Vacunas compatibles con DIVA serológica:**

En general son las capaces de distinguir entre proteínas de IVs aviáres circulantes y las correspondientes al virus vacunal: NP, NA, NS. Así pueden utilizarse los títulos de IH en aves vacunadas e infectadas experimentalmente confrontadas con los resultados ELISA para la detección de anticuerpos contra la nucleoproteína (NP) en aves vacunadas con vacunas compatibles con DIVA (EFSA, 2024). También pueden efectuarse estos ensayos ELISA frente a la detección de anticuerpos contra otras proteínas víricas.

Vacunas compatibles con DIVA serológica: Obviamente la capacidad de diferenciación, y por tanto la estrategia DIVA, será tanto mas efectiva cuántas más proteínas difieran entre la vacuna y el IV infectante (de campo). Así:

- Vacunas vectorizadas HVT (asociadas a células vivas)
- Vacunas de ADN
- Vacunas de ARN autoamplificado
- Vacunas ND vectorizadas (inactivadas + adyuvantes)
- Vacunas de subunidades (HA recombinante)
- Partículas similares a virus
- Vacunas de virus completo inactivado (VTI) de ingeniería inversa (rg)
- Vacunas de virus completo inactivado (WIV)

Estas dos últimas vacunas tienen algunas limitaciones, pero siguen siendo compatibles. Se requiere la presencia de una neuraminidasa heteróloga en la vacuna para diferenciarlas. Los anticuerpos anti-NS1 pueden estar presentes, aunque con menor sensibilidad. También se necesita la presencia de una neuraminidasa heteróloga en la vacuna para diferenciarlas; además, se utilizan ELISA anti NP y NS1.

---

82.- Inmunodifusión en gel de Agar.

83.- Ectodominio de la Proteína de Matriz M2.

### **Estrategia “tipo DIVA”: Vigilancia centinela mediante centinelas no vacunados**

El uso de aves centinela y la monitorización constante de la situación de la parvada no se ajustan a la definición estricta de una estrategia DIVA (Diferenciación entre Animales Vacunados e Infecciones Activas), pero estos métodos pueden emplearse para supervisar las parvadas vacunadas. Si se decide implementar la vigilancia centinela, es necesario mantener un porcentaje determinado de aves centinela no vacunadas (normalmente el 1%), distribuir las adecuadamente en la parvada vacunada y someterlas a pruebas virológicas y serológicas.

### **Limitaciones de la DIVA serológica:**

Sin un cumplimiento riguroso por parte de los ganaderos y un sistema de gestión adecuado, la presencia de aves centinela en la parvada puede facilitar la introducción y transmisión del Virus de Influenza Aviar Altamente Patógeno (VIAAP) en este grupo de aves. Desde el punto de vista logístico, resulta complejo identificar a los animales en grandes bandadas. Además, los resultados serológicos “falsos positivos” no son infrecuentes, lo que dificulta la interpretación y provoca interrupciones innecesarias en el comercio. También se presenta la reactividad cruzada de los anticuerpos contra el Virus de Influenza Aviar de Baja Patogenicidad (LPAIV).

El muestreo serológico puede necesitar confirmación por el virológico EFSA (2023,24).

Los patos son susceptibles (posibles portadores asintomáticos) de muchos influenzavirus.

Las aves de cría ecológica, criadas en libertad y de traspatio presentan un mayor riesgo de exposición a virus de gripe aviar diferentes del H5Nx.

Las estrategias de refuerzo heterólogo con diversas tecnologías de vacunas podrían limitar el número de opciones de diagnóstico diferencial (vacuados/infectados).

Los ensayos NP-ELISA se pueden utilizar para detectar infecciones pasadas en aves vacunadas (enfoque DIVA), si se utilizan vacunas compatibles (es decir, vacunas que no contengan la Nucleoproteína de influenzavirus aviar en la formulación).

La cocirculación de virus de la influenza aviar de baja patogenicidad puede interferir con las medidas de vigilancia diagnóstica molecular y serológica en las parvadas vacunadas contra la gripe aviar altamente patógena, así como en las no vacunadas. Debe disponerse (en laboratorios oficiales) de métodos moleculares que permitan identificar todos los virus de la influenza aviar, incluidos los LPAIV (baja patogenicidad), hasta los niveles de subtipo y patotipo (influenzavirus A aviares que difieren por su capacidad patogénica).

El método de diagnóstico más efectivo para la detección de HPAIV (alta patogenicidad) en parvadas vacunadas es la RT-qPCR (método molecular de detección cuantitativa de ARN por transcripción inversa), por su mayor sensibilidad y especificidad.

Es muy recomendable la caracterización genética de todos los virus identificados detectados en parvadas vacunadas. Así como su posible adaptación a especies mamíferas (EFSA, 2023,24).

## **Medidas de restricción y mitigación de riesgos con la Influenza Aviar (EFSA, 2024)**

1. La influenza aviar de alta patogenicidad como categoría A+D+E. Por tanto, es una enfermedad sobre la que deben tomarse medidas de erradicación inmediatas tan pronto como se detecte su existencia. También deberán adoptarse medidas para evitar su propagación ante la entrada o desplazamientos entre Estados miembros y se deberá elaborar un sistema de vigilancia para su control.

2. La influenza aviar de baja patogenicidad como categoría D+E, siendo necesaria la aplicación de medidas para evitar su propagación frente a las importaciones o desplazamientos entre Estados Miembros y, también, el ejercer una vigilancia de dicha enfermedad, pero no se considera de notificación inmediata, ni se requieren medidas de contingencia ante su sospecha o confirmación (**Reglamento de Ejecución (UE) 2018/1882**).

## **Actuación Ante Brotes**

(MAPA. SECRETARÍA GENERAL DE AGRICULTURA Y ALIMENTACIÓN. DIRECCIÓN GENERAL DE SANIDAD DE LA PRODUCCIÓN AGROALIMENTARIA Y BIENESTAR ANIMAL. SUBDIRECCIÓN GENERAL DE SANIDAD E HIGIENE ANIMAL Y TRAZABILIDAD, 2024)

Si aparece un brote de gripe aviar altamente patógena, la Unión Europea establece:

- **Sacrificio de todas las aves de la explotación** y destrucción de sus cadáveres y huevos.
- **Movimientos controlados** de las aves de corral, y sus productos, estiércoles y todo aquel material relacionado con el manejo de las aves que pudiese estar contaminado, en las áreas declaradas, para evitar la propagación del virus.
- Estrictas **medidas de bioseguridad**, desinfección de instalaciones, material y vehículos de transporte que pudiesen estar contaminados.
- **Rastreabilidad** y vigilancia para determinar la fuente de contagio y las vías de expansión de la enfermedad.
- **Zonificación** para establecer áreas infectadas y aquellas libres de la enfermedad, así como **compartimentalización** territorial para controlar los movimientos de vehículos que puedan suponer un riesgo para la transmisión de la enfermedad.

La normativa comunitaria contempla la posibilidad de realizar **vacunación de emergencia**, como complemento de las medidas de control a corto plazo para contener un foco cuando una evaluación de riesgo indique que existe una amenaza significativa e inmediata de introducción o propagación de la influenza aviar, o cuando se haya declarado un foco. La decisión de introducir la vacunación como medida de control deberá ser tomada por el Estado Miembro en colaboración con la Comisión de acuerdo con un plan aprobado por el Standing Committee on Plants, Animals, Food and Feed (Comité PAFF). Dicho plan de vacunación estará en línea con una estrategia DIVA. **Reglamento de Ejecución (UE) 2018/1882**.

Asimismo, se autoriza también la **vacunación preventiva** de las aves de corral u otras aves cautivas como medida a largo plazo. Consultar Reglamento Delegado UE 2020/687.

## BIBLIOGRAFÍA

- 3tres3.com 2023 [https://repositori.irta.cat/bitstream/handle/20.500.12327/2583/Martínez\\_Inmunidad\\_2023.pdf?sequence=1](https://repositori.irta.cat/bitstream/handle/20.500.12327/2583/Martínez_Inmunidad_2023.pdf?sequence=1).
- 3tres3.com [https://www.3tres3.com/articulos/neumonias-causadas-por-virus-en-los-cerdos\\_44458/](https://www.3tres3.com/articulos/neumonias-causadas-por-virus-en-los-cerdos_44458/).
- 3tres3.com [https://www.3tres3.com/articulos/patogenia-de-la-infeccion-por-el-virus-de-la-influenza-a-en-cerdos\\_34670/8046-8052](https://www.3tres3.com/articulos/patogenia-de-la-infeccion-por-el-virus-de-la-influenza-a-en-cerdos_34670/8046-8052).
- Aghajani Mir M. Vault RNAs (vtRNAs): Rediscovered non-coding RNAs with diverse physiological and pathological activities. *Genes Dis.* 2023 Mar 23;11(2):772-787. doi: 10.1016/j.gendis.2023.01.014. PMID: 37692527; PMCID: PMC10491885.
- Agüero, M.; I. Monne, A. Sánchez, B. Zecchin, A. Fusaro, M. J. Ruano, M. Del Valle Arrojo, R. Fernández-Antonio, A. M. Souto, P. Tordable, J. Cañas, F. Bonfante, E. Giussani, C. Terregino, J. J. Orejas, Highly pathogenic avian influenza A(H5N1) virus infection in farmed minks, Spain, October 2022. *Euro Surveill.* 28 (2023).
- Ahmad, N.; Khan, M.A.; Owais, M. Fusogenic potential of prokaryotic membrane lipids: Implication in vaccine development. *Eur. J. Biochem.* 2001, 268, 1–10. [CrossRef].
- Ahn M, Anderson DE, Zhang Q, Tan CW, Lim BL, Luko K, et al. Dampened NLRP3-mediated inflammation in bats and implications for a special viral reservoir host. *Nat Microbiol.* (2019) 4:789–99. doi: 10.1038/s41564-019-0371-3.
- Akaike, T; Ando, M; Oda, T; Doi, T; Lijri, S; Araki, S and Maeda, H (1990) Dependence on O<sub>2</sub>-generation by xanthine oxidase of pathogenesis of influenza virus infection in mice, *J Clin Invest*, Nº 85, c. 739. <https://doi.org/10.1172/JCI114499>.
- Akondy R.S., Monson N.D., Miller J.D., Edupuganti S., Teuwen D., Wu H., Quyyumi F., Garg S., Altman J.D., Del Rio C., et al. The Yellow Fever Virus Vaccine Induces a Broad and Polyfunctional Human Memory CD8+ T Cell Response. *J. Immunol.* 2009;183:7919–7930. doi: 10.4049/jimmunol.0803903. [DOI] [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar].
- Allen C.D., Cyster J.G. *Seminars in Immunology*. Volume 20. Elsevier; Amsterdam, The Netherlands: 2008. Follicular dendritic cell networks of primary follicles and germinal centers: Phenotype and function; pp. 14–25. [DOI] [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar].
- Almond JW. 1977. A single gene determines the host range of influenzavirus. *Nature* 270:617– 618. <https://doi.org/10.1038/270617a0>.
- Amanna IJ, Carlson NE, Slifka MK. Duration of humoral immunity to common viral and vaccine antigens. *N Engl J Med* 2007; 357:1903–15. [DOI] [PubMed] [Google Scholar].
- ANDERSON T.K., CHANG J., ARENDSEE Z.W., VENKATESH D., SOUZA C.K., KIMBLE J.B., LEWIS N.S., DAVIS C.T. & VINCENT A.L.(2021). Swine Influenza A Viruses and the Tangled Relationship with Humans. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.*, 11(3):a038737. doi: 10.1101/cshperspect.a038737.
- Anderson TK, Macken CA, Lewis NS, Scheuermann RH, Van Reeth K, Brown IH, Swenson SL, Simon G, Saito T, Berhane Y, Ciacchi-Zanella J, Pereda A, Davis CT, Donis RO, Webby RJ, Vincent AL. A Phylogeny-Based Global Nomenclature System and Automated Annotation Tool for H1 Hemagglutinin Genes from Swine Influenza A Viruses. *mSphere*. 2016 Dec 14;1(6):e00275-16. doi: 10.1128/mSphere.00275-16. PMID: 27981236; PMCID: PMC5156671.
- Andrews S.F., Huang Y., Kaur K., Popova L.I., Ho I.Y., Pauli N.T., Henry Dunand C.J., Taylor W.M., Lim S., Huang M., et al. Immune history profoundly affects broadly protective B cell responses to influenza. *Sci. Transl. Med.* 2015;7:316ra192. doi: 10.1126/scitranslmed.aad0522. [DOI] [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar].
- Andrews S.F., Joyce M.G., Chambers M.J., Gillespie R.A., Kanekiyo M., Leung K., Yang E.S., Tsybovsky Y., Wheatley A.K., Crank M.C., et al. Preferential induction of cross-group influenza A hemagglutinin stem-specific memory B cells after H7N9 immunization in humans. *Sci. Immunol.* 2017;2 doi: 10.1126/sciimmunol.aan2676. [DOI] [PubMed] [Google Scholar].
- Arias, CF.; López, S. *Ciencia* • julio-septiembre 2009.
- Arteaga, A; Pilar, MM; Sierra, MJ; Amela, C (2006). MEDIDAS DE VIGILANCIA Y CONTENCIÓN DE LA INFLUENZA AVIAR EN AVES. IMPLICACIONES PARA LA SALUD PÚBLICA. .
- Baigent, S.J., & J.W. McCauley. 2003. Influenza type A in humans, mammals and birds: determinants of virus virulence, host-range and interspecies transmission. *BioEssays*. 25:657–671.
- Bailey, E.S., et al. The continual threat of influenza virus infections at the human-animal interface: What is new from a one health perspective? *Evol Med Public Health* 2018, 192-198 (2018).

- Banerjee A, Baker ML, Kulcsar K, Misra V, Plowright R, Mossman K. Novel insights into immune systems of bats. *Front Immunol.* (2020) 11:26. doi: 10.3389/fimmu.2020.00026 .
- Banerjee A, Rapin N, Bollinger T, Misra V. Lack of inflammatory gene expression in bats: a unique role for a transcription repressor. *Sci Rep.* (2017) 7:2232. doi: 10.1038/s41598-017-01513-w.
- Banerjee I., Miyake Y., Nobs S.P., Schneider C., Horvath P., Kopf M., Matthias P., Helenius A., Yamauchi Y. Influenza A virus uses the aggresome processing machinery for host cell entry. *Science.* 2014;346:473–477. doi: 10.1126/science.1257037. [DOI] [PubMed] [Google Scholar].
- Bar-On, Y., Glasner, A., Meninger, T., Achdout, H., Gur, C., Lankry, D., et al. (2013). Neuraminidase-mediated, NKp46-dependent immune-evasion mechanism of influenza viruses. *Cell Rep.* 3, 1044–1050. doi: 10.1016/j.celrep.2013.03.034.
- Barber, M. R., Aldridge, J. R., Jr., Webster, R. G., & Magor, K. E. (2010). Association of RIG-I with innate immunity of ducks to influenza. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(13), 5913–5918. doi:10.1073/pnas.1001755107.
- Bergmann, M.; Garcia-Sastre, A.; Carnero, E.; Pehamberger, H.; Wolff, K.; Palese, P.; Muster, T. Influenza virus NS1 protein counteracts PKR-mediated inhibition of replication. *J. Virol.* 2000, 74, 6203–6206.
- Bergstrom JJ., Xu H., Heyman B. Epitope-Specific Suppression of IgG Responses by Passively Administered Specific IgG: Evidence of Epitope Masking. *Front. Immunol.* 2017;8:238. doi: 10.3389/fimmu.2017.00238. [DOI] [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar].
- Bernstein D.I., Guptill J., Naficy A., Nachbagauer R., Berlanda-Scorza F., Feser J., Wilson P.C., Solorzano A., Van der Wielen M., Walter E.B., et al. Immunogenicity of chimeric haemagglutinin-based, universal influenza virus vaccine candidates: Interim results of a randomised, placebo-controlled, phase 1 clinical trial. *Lancet Infect. Dis.* 2020;20:80–91. doi: 10.1016/S1473-3099(19)30393-7. [DOI] [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar].
- Beveridge W.I. The chronicle of influenza epidemics. *Hist. Philos. Life Sci.* 1991;13:223–234. [PubMed] [Google Scholar].
- Biquand E., Poirson J., Karim M., Declercq M., Malausse N., Cassonnet P., Barbezange C., Straub M.L., Jones L., Munier S., et al. Comparative profiling of ubiquitin proteasome system interplay with influenza A virus PB2 polymerase protein recapitulating virus evolution in humans. *mSphere.* 2017;2:e00330-17. doi: 10.1128/mSphere.00330-17. [DOI] [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar].
- Blanc A, Ruchansky D, Clara M, Achaval F, Le Bas A, Arbiza J. Serologic evidence of influenza A and B viruses in South American fur seals (*Arctocephalus australis*). *J Wildl Dis.* 2009;45:519–21. [DOI] [PubMed] [Google Scholar][Ref list].
- Blanchard-Rohner G., Pulickal A.S., Jol-van der Zijde C.M., Snape M.D., Pollard A.J. Appearance of peripheral blood plasma cells and memory B cells in a primary and secondary immune response in humans. *Blood.* 2009;114:4998–5002. doi: 10.1182/blood-2009-03-211052. [DOI] [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar].
- Boopathy A.V., Mandal A., Kulp D.W., Menis S., Bennett N.R., Watkins H.C., Wang W., Martin J.T., Thai N.T., He Y., et al. Enhancing humoral immunity via sustained-release implantable microneedle patch vaccination. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2019;116:16473–16478. doi: 10.1073/pnas.1902179116. [DOI] [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar].
- Bordes, L.; S. Vreman, R. Heutink, M. Roose, S. Venema, S. B. E. Pritz-Verschuren, J. M. Rijks, J. L. Gonzales, E. A. Germeraad, M. Engelsma, N. Beerens, Highly Pathogenic Avian Influenza H5N1 Virus Infections in Wild Red Foxes (*Vulpes vulpes*) Show Neurotropism and Adaptive Virus Mutations. *Microbiol Spectr* 11, e0286722 (2023).
- Bouma A., Claassen I., Natih K., Klinkenberg D., Donnelly C.A., Koch G. & van Boven M. (2009). – Estimation of transmission parameters of H5N1 avian influenza virus in chicken. *PLoS Pathog.*, 5 (1), e1000281.https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000281.
- Bouvier NM, Palese P. The biology of influenza viruses. *Vaccine.* 2008 Sep 12;26 Suppl 4(Suppl 4):D49-53. doi: 10.1016/j.vaccine.2008.07.039. PMID: 19230160; PMCID: PMC3074182.
- Boyoglu-Barnum S., Ellis D., Gillespie R.A., Hutchinson G.B., Park Y.-J., Moin S.M., Acton O.J., Ravichandran R., Murphy M., Pettie D., et al. Quadrivalent influenza nanoparticle vaccines induce broad protection. *Nature.* 2021 doi: 10.1038/s41586-021-03365-x. [DOI] [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar].
- Braciale, T. (1977). Immunologic recognition of influenza virus-infected cells. II. Expression of influenza A matrix protein on the infected cell surface and its role in recognition by cross-reactive cytotoxic T cells. *J. Exp. Med.* 146, 673–689. doi: 10.1084/jem.146.3.673.
- Braun, E.; Hotter, D.; Koepke, L.; Zech, F.; Gross, R.; Sparrer, K.M.J.; Muller, J.A.; Pfaller, C.K.; Heusinger, E.; Wombacher, R.; et al. Guanylate-Binding Proteins 2 and 5 Exert Broad Antiviral Activity by Inhibiting Furin-Mediated Processing of Viral Envelope Proteins. *Cell Rep.* 2019, 27, 2092–2104 e2010. [Google Scholar] [CrossRef].

- Brown, I. (2022). TECHNICAL ITEM In High pathogenicity avian influenza and vaccination: application in Europe Region. WOA. <https://doi.org/10.20506/TT.3335>.
- Buehler J, Navi D, Lorusso A, Vincent A, Lager K, Miller CL. Influenza A virus PB1-F2 protein expression is regulated in a strain-specific manner by sequences located downstream of the PB1-F2 initiation codon. *J Virol*. 2013;87(19):10687–99. Epub 2013/07/26. 10.1128/JVI.01520-13 [DOI] [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar].
- Buggele, W.A.; Johnson, K.E.; Horvath, C.M. Influenza A virus infection of human respiratory cells induces primary microRNA expression. *J. Biol. Chem*. 2012, 287, 31027–31040. [CrossRef] [PubMed].
- Burrough, E.; Magstadt, D.; Petersen, B.; Timmermans, S.; Gauger, P.; Zhang, J.; Siepker, C.; Mainenti, M.; Li, G.; Thompson, A.; Gorden, P.; Plummer, P. and Main, R. (2024). Highly Pathogenic Avian Influenza A(H5N1) Clade 2.3.4.4b Virus Infection in Domestic Dairy Cattle and Cats, United States, 2024 *Emerging Infectious Disease journal* 30, 7, 1335. 1080-6059.
- Bussey KA, Bousse TL, Desmet EA, Kim B, Takimoto T. PB2 residue 271 plays a key role in enhanced polymerase activity of influenza A viruses in mammalian host cells. *J Virol*. 2010;84(9):4395-406. 10.1128/JVI.02642-09 [DOI] [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar].
- Byrne, AMP; J. James, B. C. Mollett, S. M. Meyer, T. Lewis, M. Czepl, A. H. Seekings, S. Mahmood, S. S. Thomas, Ross, CS.; D. J. F. Byrne, M. J. McMenamy, V. Bailie, K. Lemon, R. D. E. Hansen, M. Falchieri, N. S. Lewis, S. M. Reid, I. H. Brown, A. C. Banyard, Investigating the Genetic Diversity of H5 Avian Influenza Viruses in the United Kingdom from 2020-2022. *Microbiol Spectr* 11, e0477622 (2023). 2.
- Cantisani R, Pezzicoli A, Cioncada R, Malzone C., De Gregorio E., D'Oro U., Piccioli D. Vaccine adjuvant MF59 promotes retention of unprocessed antigen in lymph node macrophage compartments and follicular dendritic cells. *J. Immunol*. 2015;194:1717–1725. doi: 10.4049/jimmunol.1400623. [DOI] [PubMed] [Google Scholar].
- Carlander D, Stalberg J, Larsson A (1999) Chicken antibodies: a clinical chemistry perspective. *Ups J Med Sci* 104: 179–189.
- Carpenter S., Aiello D., Atianand M.K., Ricci E.P., Gandhi P., Hall L.L., Byron M., Monks B., Henry-Bezy M., Lawrence J.B. A long noncoding RNA mediates both activation and repression of immune response genes. *Science*. 2013;341:789–792. doi: 10.1126/science.1240925. [DOI] [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar].
- Carr E.J., Wheatley A.K., Hill D.L., Linterman M.A. The memory B cell response to influenza vaccination is impaired in older persons. *bioRxiv*. 2021 doi: 10.1101/2021.03.04.433942. [DOI] [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar].
- Carter T, Iqbal M. The Influenza A Virus Replication Cycle: A Comprehensive Review. *Viruses*. 2024 Feb 19;16(2):316. doi: 10.3390/v16020316. PMID: 38400091; PMCID: PMC10892522.
- Centers for Disease Control and Prevention website. Information on swine/variant influenza. [www.cdc.gov/flu/swineflu/index.htm](http://www.cdc.gov/flu/swineflu/index.htm). Updated May 1, 2023. Accessed June 8, 2023.
- Centers for Disease Control and Prevention, National Center for Immunization and Respiratory Diseases (NCIRD).
- Chakrabarti A.K., Pasricha G. An insight into the PB1F2 protein and its multifunctional role in enhancing the pathogenicity of the influenza A viruses. *Virology*. 2013;440:97–104. doi:10.1016/j.virol.2013.02.025. [DOI] [PubMed] [Google Scholar].
- Chan MC, Lee N, Chan PK et al. Seasonal influenza A virus in feces of hospitalized adults. *Emerg Infect Dis* 2011; 17:2038–2042.
- Chan MC, Lee N, Chan PK, To KF, Wong RY, Law CO, Ngai KL, Sung JJ. Intestinal binding of seasonal influenza A viruses to DC-SIGN(+) CD68(+) cells. *Influenza Other Respir Viruses*. 2013 May;7(3):228–30. doi: 10.1111/j.1750-2659.2012.00402.x. Epub 2012 Jul 13. PMID: 22788772; PMCID: PMC5779836.
- Chan, M., Cheung, C., Chui, W. et al. Proinflammatory cytokine responses induced by influenza A (H5N1) viruses in primary human alveolar and bronchial epithelial cells. *Respir Res* 6, 135 (2005). <https://doi.org/10.1186/1465-9921-6-135>.
- Chen C., Zhuang X. Epsin 1 is a cargo-specific adaptor for the clathrin-mediated endocytosis of the influenza virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2008;105:11790–11795. doi: 10.1073/pnas.0803711105. [DOI] [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar].
- Chen H, Yuan H, Gao R, Zhang J, Wang D, Xiong Y, Fan G, Yang F, Li X, Zhou J, Zou S, Yang L, Chen T, Dong L, Bo H, Zhao X, Zhang Y, Lan Y, Bai T, Dong J, Li Q, Wang S, Zhang Y, Li H, Gong T, Shi Y, Ni X, Li J, Zhou J, Fan J, Wu J, Zhou X, Hu M, Wan J, Yang W, Li D, Wu G, Feng Z, Gao GF, Wang Y, Jin Q, Liu M, Shu Y. 2014. Clinical and epidemiological characteristics of a fatal case of avian influenza A H10N8 virus infection: a descriptive study. *Lancet* 383:714–721. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)60111-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)60111-2).
- Chen W, Calvo PA, Malide D, Gibbs J, Schubert U, Bacik I, et al. Una nueva proteína mitocondrial del virus de la gripe A que induce la muerte celular. *Nat Med*. 2001 Dic;7(12):1306–12. doi: 10.1038/nm1201-1306. [DOI] [PubMed] [Google Scholar].

- Chen Y.Q., Wohlbold T.J., Zheng N.Y., Huang M., Huang Y., Neu K.E., Lee J., Wan H., Rojas K.T., Kirkpatrick E., et al. Influenza Infection in Humans Induces Broadly Cross-Reactive and Protective Neuraminidase-Reactive Antibodies. *Cell*. 2018;173:417–429 e410. doi: 10.1016/j.cell.2018.03.030. [DOI] [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar].
- Chen, X., Liu, S., Goraya, M. U., Maarouf, M., Huang, S., and Chen, J.-L. (2018). Host immune response to Influenza A virus infection. *Front. Immunol.* 9:320. doi: 10.3389/fimmu.2018.00320.
- Chen, Z., Li, Y., Krug, R. M. (1999). Influenza A virus NS1 protein targets poly(A)-binding protein II of the cellular 3'-end processing machinery. *EMBO J.* 18 (8), 2273–2283. doi: 10.1093/emboj/18.8.2273.
- Chenavas S, Estrozi LF, Slama-Schwok A, Delmas B, Di Primo C, Baudin F, Li X, Crepin T, Ruigrok RW. 2013. Monomeric nucleoprotein of influenza A virus. *PLoS Pathog* 9:e1003275. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1003275>.
- Cheng X.W., Lu J., Wu C.L., Yi L.N., Xie X., Shi X.D., Fang S.S., Zan H., Kung H.F., He M.L. Three fatal cases of pandemic 2009 influenza A virus infection in Shenzhen are associated with cytokine storm. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 2011;175:185–187. doi: 10.1016/j.resp.2010.11.004. [DOI] [PubMed] [Google Scholar].
- Chesarino, N.M.; McMichael, T.M.; Yount, J.S. E3 Ubiquitin Ligase NEDD4 Promotes Influenza Virus Infection by Decreasing Levels of the Antiviral Protein IFITM3. *PLoS Pathog.* 2015, 11, e1005095. [Google Scholar] [CrossRef].
- Cho, H. & Kelsall, B. L. (2014). The role of type I interferons in intestinal infection, homeostasis and inflammation. *Immunol Rev.*, 260(1), 145-167. [ Links ].
- Cohen M, Zhang XQ, Senaati HP, Chen HW, Varki NM, Schooley RT, et al. Influenza A penetrates host mucus by cleaving sialic acids with neuraminidase. *Virology* (2013) 10(1):321. 10.1186/1743-422X-10-321 [DOI] [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar].
- Coleman, KK et Bemis, IG. Avian Influenza Virus Infections in Felines: A Systematic Review of Two Decades of LiteraturemedRxiv 2024.04.30.24306585; doi:https://doi.org/10.1101/2024.04.30.24306585 .
- Connor, R.J.; Kawaoka, Y.; Webster, R.G.; Paulson, J.C. Receptor specificity in human, avian, and equine H2 and H3 influenza-virus isolates. *Virology* 1994, 205, 17–23. [CrossRef].
- Cordero RA, Lai CJ, Choppin PW. Secuencias de ARNm derivados del segmento 7 de ARN del genoma del virus de la gripe: los ARNm colineales e interrumpidos codifican proteínas superpuestas. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1981 Jul;78(7):4170–4. doi: 10.1073/pnas.78.7.4170. [DOI] [Artículo gratuito de PMC] [PubMed] [Google Scholar].
- Crowe JE. Antibody Determinants of Influenza Immunity. *J Infect Dis.* 2019 Apr 8;219(Suppl\_1):S21-S29. doi: 10.1093/infdis/jiz010. PMID: 30715373; PMCID: PMC6452307.
- Darricarrere N., Qiu Y., Kanekiyo M., Creanga A., Gillespie R.A., Moin S.M., Saleh J., Sancho J., Chou T.H., Zhou Y., et al. Broad neutralization of H1 and H3 viruses by adjuvanted influenza HA stem vaccines in nonhuman primates. *Sci. Transl. Med.* 2021;13 doi: 10.1126/scitranslmed.abe5449. [DOI] [PubMed] [Google Scholar].
- Davis AKF, McCormick K, Gumina ME, Petrie JG, Martin ET, Xue KS, Bloom JD, Monto AS, Bushman FD, Hensley SE. 2018. Sera from Individuals with Narrowly Focused Influenza Virus Antibodies Rapidly Select Viral Escape Mutations In Ovo . *Journal of Virology* 92. DOI: <https://doi.org/10.1128/JVI.00859-18>.
- Davis M.E., Gack M.U. Ubiquitination in the antiviral immune response. *Virology.* 2015;479–480:52–65. doi: 10.1016/j.virol.2015.02.033. [DOI] [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar] [Ref list].
- de Jong MD, Simmons CP, Thanh TT, Hien VM, Smith GJ, Chau TN, Hoang DM, Chau NV, Khanh TH, Dong VC, Qui PT, Cam BV, Ha do Q, Guan Y, Peiris JS, Chinh NT, Hien TT, Farrar J. Fatal outcome of human influenza A (H5N1) is associated with high viral load and hypercytokinemia. *Nat Med.* 2006 Oct;12(10):1203-7. doi: 10.1038/nm1477. Epub 2006 Sep 10. PMID: 16964257; PMCID: PMC4333202.
- Delmas B., Escriou N., Le Goffic R. Kinetic characterization of PB1-F2-mediated immunopathology during highly pathogenic avian H5N1 influenza virus infection. *PLoS ONE.* 2013;8:e57894. doi: 10.1371/journal.pone.0057894. [DOI ] [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar].
- Denz PJ, Speaks S, Kenney AD, Eddy AC, Papa JL, Roettger J, Scace SC, Hemann EA, Forero A, Webby RJ, Bowman AS, Yount JS. Innate immune control of influenza virus interspecies adaptation. *bioRxiv* [Preprint]. 2023 Aug 23:2023.08.23.554491. doi: 10.1101/2023.08.23.554491. PMID: 37662304; PMCID: PMC10473703.
- Di Pietro A., Kajaste-Rudnitski A., Oteiza A., Nicora L., Towers G.J., Mechti N., Vicenzi E. TRIM22 inhibits influenza A virus infection by targeting the viral nucleoprotein for degradation. *J. Virol.* 2013;87:4523–4533. doi: 10.1128/JVI.02548-12. [DOI ] [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar].
- Dias A, Bouvier D, Crepin T, McCarthy AA, Hart DJ, Baudin F, Cusack S, Ruigrok RW. 2009. The cap-snatching endonuclease of influenza virus polymerase resides in the PA subunit. *Nature* 458:914–918. <http://dx.doi.org/10.1038/nature07745>.

- DiazGranados C.A., Dunning A.J., Kimmel M., Kirby D., Treanor J., Collins A., Pollak R., Christoff J., Earl J., Landolfi V., et al. Efficacy of high-dose versus standard-dose influenza vaccine in older adults. *N. Engl. J. Med.* 2014;371:635–645. doi: 10.1056/NEJMoa1315727.[DOI] [PubMed] [Google Scholar].
- Dou, Y., Fu, B., Sun, R., Li, W., Hu, W., Tian, Z., et al. (2015). Influenza vaccine induces intracellular immune memory of human NK cells. *PLoS ONE* 10:e0121258. doi: 10.1371/journal.pone.0121258.
- Du Y., Yang F., Wang Q., Xu N., Xie Y., Chen S., Qin T., Peng D. Influenza A virus antagonizes type I and type II interferon responses via SOCS1-dependent ubiquitination and degradation of JAK1. *Viol. J.* 2020;17:74. doi: 10.1186/s12985-020-01348-4. [DOI] [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar][Ref list].
- Duev-Cohen, A., Bar-On, Y., Glasner, A., Berhani, O., Ophir, Y., Levi-Schaffer, F., et al. (2016). The human 2B4 and NTB-A receptors bind the influenza viral hemagglutinin and co-stimulate NK cell cytotoxicity. *Oncotarget* 7, 13093–13105. doi: 10.18632/oncotarget.7597.
- Dugan H.L., Guthmiller J.J., Arevalo P., Huang M., Chen Y.Q., Neu K.E., Henry C., Zheng N.Y., Lan L.Y., Tepora M.E., et al. Preexisting immunity shapes distinct antibody landscapes after influenza virus infection and vaccination in humans. *Sci. Transl. Med.* 2020;12 doi: 10.1126/scitranslmed.abd3601. [DOI] [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar].
- Duthie, M. S., Kahn, M., White, M., Kapur, R. P. and Kahn, S. J., Critical proinflammatory and anti-inflammatory functions of different subsets of CD1d-restricted natural killer T cells during *Trypanosoma cruzi* infection. *Infect. Immun.* 2005. 73: 181–192.
- Dutta, Sanchari Sinha Dutta. (2025, 25 de febrero). Descubrimiento de una nueva cepa de gripe de murciélago con potencial para infectar a otras especies. Noticias-Médico. Recuperado el 5 de marzo de 2025 de <https://www.news-medical.net/news/20250225/Discovery-of-new-bat-flu-strain-with-potential-to-infect-other-species.aspx>.
- Dwivedi V, Manickam C, Dhakal S, Binjawadagi B, Ouyang K, Hiremath J, Khatri M, Hague JG, Lee CW, Renukaradhya GJ. Adjuvant effects of invariant NKT cell ligand potentiates the innate and adaptive immunity to an inactivated H1N1 swine influenza virus vaccine in pigs. *Vet Microbiol.* 2016 Apr 15;186:157-63. doi: 10.1016/j.vetmic.2016.02.028. Epub 2016 Mar 2. PMID: 27016770.
- Echeverri-De la Hoz, D., Martínez-Bravo, C., Gastelbondo-Pastrana, B., et al. (2025). Genómica del nuevo virus de la influenza A (H18N12) en murciélagos, Caribe Colombia. *Informes científicos*. doi:10.1038/s41598-025-91026-8 .
- EFSA (European Food Safety Authority), ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control), EURL (European Union Reference Laboratory for Avian Influenza), Alexakis L, Buczkowski H, Ducatez M, Fusaro A, Gonzales JL, Kuiken T, Ståhlk, Staubach C, Svartström O, Terregino C, Willgert K, Delacourt R and Kohnle L, 2024.Scientific report: Avian influenza overview June–September 2024. *EFSA Journal* 2024;22(10):9057, 66 pp. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2024.9057>.
- EFSA AHAW Panel (EFSA Panel on Animal Health and Animal Welfare), European Union Reference Laboratory for Avian Influenza, Nielsen, S. S., Alvarez, J., Bicout, D. J., Calistri, P., Canali, E., Drewe, J. A., Garin-Bastuji, B., Gortázar, C., Herskin, M. S., Michel, V., Miranda Chueca, M. Á., Padalino, B., Roberts, H. C., Spooler, H., Stahl, K., Velarde, A., ... Gonzales Rojas, J. L. (2024). Vaccination of poultry against highly pathogenic avian influenza – Part 2. Surveillance and mitigation measures. *EFSA Journal*, 22(4), e8755. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2024.8755>.
- EFSA Panel on Animal Health and Animal Welfare (AHAW), European Union Reference Laboratory for Avian Influenza, Nielsen, S. S., Alvarez, J., Bicout, D. J., Calistri, P., Canali, E., .. & Viltrop, A. (2023). Vaccination of poultry against highly pathogenic avian influenza–part 1. Available vaccines and vaccination strategies. *EFSA Journal*, 21(10), e08271.
- Einav, T.; Kosikova, M.; Radvak, P.; Kuo, Y.-C.; Kwon, H.J.; Xie, H. Mapping the Antibody Repertoires in Ferrets with Repeated Influenza A/H3 Infections: Is Original Antigenic Sin Really “Sinful”? *Viruses* 2023, 15, 374. <https://doi.org/10.3390/v15020374>.
- Ekiert, D.C.; Kashyap, A.K.; Steel, J.; Rubrum, A.; Bhabha, G.; Khayat, R.; Lee, J.H.; Dillon, M.A.; O’Neil, R.E.; Faynboym, A.M.; et al. Cross-neutralization of influenza A viruses mediated by a single antibody loop. *Nature* 2012, 489, 526–532. [CrossRef] [PubMed].
- Everitt, A.R., et al. IFITM3 restricts the morbidity and mortality associated with influenza. 527 *Nature* 484, 519-523 (2012).
- Fei C, Li Z, Li C, Chen Y, Chen Z, He X, Mao L, Wang X, Zeng R, Li L. Smurf1-mediated Lys29-linked nonproteolytic polyubiquitination of axin negatively regulates Wnt/ $\beta$ -catenin signaling. *Mol Cell Biol.* 2013 Oct;33(20):4095-105. doi: 10.1128/MCB.00418-13. Epub 2013 Aug 19. PMID: 23959799; PMCID: PMC3811687.
- Fifis T., Gamvrellis A., Crimeen-Irwin B., Pietersz G.A., Li J., Mottram P.L., McKenzie I.F.C., Plebanski M. Size-Dependent Immunogenicity: Therapeutic and Protective Properties of Nano-Vaccines against Tumors. *J. Immunol.* 2004;173:3148–3154. doi: 10.4049/jimmunol.173.5.3148. [DOI] [PubMed] [Google Scholar].

- Finkin S., Hartweiger H., Oliveira T.Y., Kara E.E., Nussenzweig M.C. Protein Amounts of the MYC Transcription Factor Determine Germinal Center B Cell Division Capacity. *Immunity*. 2019;51:324–336 e325. doi: 10.1016/j.immuni.2019.06.013. [DOI] [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar].
- Fire A. Nucleic acid structure and intracellular immunity: some recent ideas from the world of RNAi. *Q Rev Biophys*. 2005 Nov;38(4):303–9. doi: 10.1017/S0033583505004117. Epub 2006 Mar 6. PMID: 16515739.
- Fischer H, Tschachler E and Eckhart L (2020) Pangolins Lack IFIH1/MDA5, a Cytoplasmic RNA Sensor That Initiates Innate Immune Defense Upon Coronavirus Infection. *Front. Immunol*. 11:939. doi: 10.3389/fimmu.2020.00939.
- Fiszon, B., C. Hannoun, A. Garcia-Sastre, E. Villar, & J.A. Cabezas. 1989. Comparison of biological and physical properties of human and animal A(H1N1) influenza viruses. *Res. Virol*. 140:395–404.
- Fletcher A.J., Christensen D.E., Nelson C., Tan C.P., Schaller T., Lehner P.J., Sundquist W.I., Towers G.J. TRIM5alpha requires Ube2W to anchor Lys63-linked ubiquitin chains and restrict reverse transcription. *EMBO J*. 2015;34:2078–2095. doi: 10.15252/embj.201490361. [DOI] [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar].
- Fodor E. 2013. The RNA polymerase of influenza A virus: mechanisms of viral transcription and replication. *Acta Virol* 57:113–122. doi: 10.4149/av\_2013\_02\_113. [DOI] [PubMed] [Google Scholar].
- Fodor, E.; E. Staller, L. Carrique, O. Swann, H. Fan, J. Keown, C. Sheppard, W. Barclay, J. Grimes, Structures of H5N1 influenza polymerase with ANP32B reveal mechanisms of genome replication and host adaptation. doi: 10.21203/rs.3.rs-3716220/v1 (2024).
- Fonville J.M., Wilks S.H., James S.L., Fox A., Ventresca M., Aban M., Xue L., Jones T.C., Le N.M.H., Pham Q.T., et al. Paisajes de anticuerpos después de la infección o vacunación por el virus de la gripe. *Ciencia*. 2014;346:996–1000. doi: 10.1126/science.1256427. [DOI] [Artículo gratuito de PMC] [PubMed] [Google Scholar][Lista de referencias].
- Frank, K; Paust, S. (2020) Dynamic Natural Killer Cell and T Cell Responses to Influenza Infection. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, VOLUME 10. URL=https://www.frontiersin.org/journals/cellular-and-infection-microbiology/articles/10.3389/fcimb.2020.00425. DOI=10.3389/fcimb.2020.00425. ISSN=2235-2988.
- Frasca D., Van der Put E., Riley R.L., Blomberg B.B. Reduced Ig class switch in aged mice correlates with decreased E47 and activation-induced cytidine deaminase. *J. Immunol*. 2004;172:2155–2162. doi: 10.4049/jimmunol.172.4.2155. [DOI] [PubMed] [Google Scholar].
- Fu B, Wang L, Ding H, Schwamborn JC, Li S, Dorf ME. 2015. TRIM32 senses and restricts influenza A virus by ubiquitination of PB1 polymerase. *PLoS Pathog* 11:e1004960. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1004960>.
- Fujisawa, H., Inhibitory role of neutrophils on influenza virus multiplication in the lungs of mice. *Microbiol. Immunol*. 2001. 45: 679–688.
- Fujisawa, H., Neutrophils play an essential role in cooperation with antibody in both protection against and recovery from pulmonary infection with influenza virus in mice. *J. Virol*. 2008. 82: 2772–2283.
- Fujisawa, H., Tsuru, S., Taniguchi, M., Zinnaka, Y. and Nomoto, K., Protective mechanisms against pulmonary infection with influenza virus. I. Relative contribution of polymorphonuclear leukocytes and of alveolar macrophages to protection during the early phase of intranasal infection. *J. Gen. Virol*. 1987. 68: 425–432.
- Fukuyama S., Kawaoka Y. The pathogenesis of influenza virus infections: The contributions of virus and host factors. *Curr. Opin. Immunol*. 2011;23:481–486. doi: 10.1016/j.coi.2011.07.016. [DOI] [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar] [Ref list].
- Gack M.U., Albrecht R.A., Urano T., Inn K.S., Huang I.C., Carnero E., Farzan M., Inoue S., Jung J.U., Garcia-Sastre A. Influenza A virus NS1 targets the ubiquitin ligase TRIM25 to evade recognition by the host viral RNA sensor RIG-I. *Cell Host Microbe*. 2009; 5:439–449. doi: 10.1016/j.chom.2009.04.006. [DOI] [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar][Ref list].
- Gack M.U., Shin Y.C., Joo C.H., Urano T., Liang C., Sun L., Takeuchi O., Akira S., Chen Z., Inoue S., et al. TRIM25 RING-finger E3 ubiquitin ligase is essential for RIG-I-mediated antiviral activity. *Nature*. 2007; 446:916–920. doi: 10.1038/nature05732. [DOI] [PubMed] [Google Scholar].
- Gao, S., Song, L., Li, J., Zhang, Z., Peng, H., Jiang, W., et al. (2012). Influenza A virus-encoded NS1 virulence factor protein inhibits innate immune response by targeting IKK. *Cell Microbiol*. 14 (12), 1849–1866. doi: 10.1111/cmi.12005.
- Geiler J, Michaelis M, Naczek P, Leutz A, Langer K, Doerr HW, Cinatl J Jr. N-acetyl-L-cysteine (NAC) inhibits virus replication and expression of pro-inflammatory molecules in A549 cells infected with highly pathogenic H5N1 influenza A virus. *Biochem Pharmacol*. 2010 Feb 1;79(3):413–20. doi: 10.1016/j.bcp.2009.08.025. Epub 2009 Sep 2. PMID: 19732754.
- Giese M, Harder TC, Teifke JP, Klopfeisch R, Breithaupt A, Mettenleiter TC, Vahlenkamp TW. Experimental infection and natural contact exposure of dogs with avian influenza virus (H5N1). *Emerg Infect Dis*. 2008;14:308–10.

- Gitlin A.D., Shulman Z., Nussenzweig M.C. Clonal selection in the germinal centre by regulated proliferation and hypermutation. *Nature*. 2014;509:637–640. doi: 10.1038/nature13300. [DOI] [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar].
- Goenka R., Scholz J.L., Naradikian M.S., Cancro M.P. Memory B cells form in aged mice despite impaired affinity maturation and germinal center kinetics. *Exp. Gerontol*. 2014;54:109–115. doi: 10.1016/j.exger.2013.12.013. [DOI] [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar].
- Gomez J.A., Wapinski O.L., Yang Y.W., Bureau J.F., Gopinath S., Monack D.M., Chang H.Y., Brahic M., Kirkegaard K. The NeST long ncRNA controls microbial susceptibility and epigenetic activation of the interferon- $\gamma$  locus. *Cell*. 2013;152:743–754. doi: 10.1016/j.cell.2013.01.015.[DOI] [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar].
- Gostic K.M., Ambrose M., Worobey M., Lloyd-Smith J.O. Potent protection against H5N1 and H7N9 influenza via childhood hemagglutinin imprinting. *Science*. 2016;354:722–726. doi: 10.1126/science.aag1322. [DOI] [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar].
- Gostic K.M., Bridge R., Brady S., Viboud C., Worobey M., Lloyd-Smith J.O. Childhood immune imprinting to influenza A shapes birth year-specific risk during seasonal H1N1 and H3N2 epidemics. *PLoS Pathog*. 2019;15:e1008109. doi: 10.1371/journal.ppat.1008109. [DOI] [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar].
- Graham DB, Robertson CM, Bautista J, Mascarenhas F, Diacovo MJ, Montgrain V, Lam SK, Cremasco V, Dunne WM, Faccio R, Coopersmith CM, and Swat W. Neutrophil mediated oxidative burst and host defense are controlled by a Vav-PLC-gamma2 signaling axis in mice. *J Clin Invest* 117: 3445–3452, 2007.
- Greenspan, D., Palese, P., Krystal, M. (1988). Two nuclear location signals in the influenza virus NS1 nonstructural protein. *J. Virol.* 62 (8), 3020–3026. doi: 10.1128/JVI.62.8.3020-3026.1988.
- Groth, M. et al. The genome of an influenza virus from a pilot whale: relation to influenza viruses of gulls and marine mammals. *Infect., Genet. Evol.* 24, 183–186 (2014).
- Gu M, Zhao G, Zhao K, Zhong L, Huang J, Wan H, Liu W, Liu H, Peng D, Liu X. Nuevas variantes de virus de la gripe aviar altamente patógena del clado 2.3.4 virus de la gripe aviar A(H5N1), China. *Emergencia Infecta Dis*. 2013;19:2021–4. doi: 10.3201/eid1912.130340. PMID:24274396 [DOI] [Artículo gratuito de PMC] [PubMed] [Google Scholar][Lista de referencia].
- Guan Z., Liu D., Mi S., Zhang J., Ye Q., Wang M., Gao G.F., Yan J. Interaction of Hsp40 with influenza virus M2 protein: Implications for PKR signaling pathway. *Protein Cell*. 2010;1:944–955. doi: 10.1007/s13238-010-0115-x. [DOI] [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar].
- Gui, S.; Chen, X.; Zhang, M.; Zhao, F.;Wan, Y.;Wang, L.; Xu, G.; Zhou, L.; Yue, X.; Zhu, Y.; et al. Mir-302cmediates influenza A virus-induced IFN expression by targeting NF- $\kappa$ B inducing kinase. *FEBS Lett*. 2015, 589, 4112–4118. [CrossRef] [PubMed].
- Guilligay D Tarendeau F, Resa-Infante P, Coloma R, Crepin T, Sehr P, Lewis J, Ruigrok RW, Ortin J, Hart DJ, Cusack S (2008) The structural basis for cap-binding by influenza virus polymerase subunit PB2. *Nature Structural and Molecular Biology* 15(5): 500-106. doi: 10.1038/nsmb.1421.
- Gulati S, Smith DF, Cummings RD, Couch RB, Griesemer SB, St GK, et al. Human H3N2 influenza viruses isolated from 1968 to 2012 show varying preference for receptor substructures with no apparent consequences for disease or spread. *PLoS One* (2013) 8(6):e66325. 10.1371/journal.pone.0066325 [DOI] [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar].
- Guo, H., Santiago, F., Lambert, K., Takimoto, T., and Topham, D. J. (2011). T cell-mediated protection against Lethal 2009 pandemic H1N1 Influenza virus infection in a mouse model. *J. Virol.* 85, 448–455. doi: 10.1128/JVI.01812-10.
- Guthmiller JJ., Han J., Li L., Freyn A.W., Liu S.T.H., Stovicek O., Stamper C.T., Dugan H.L., Tepora M.E., Utset H.A., et al. First exposure to the pandemic H1N1 virus induced broadly neutralizing antibodies targeting hemagglutinin head epitopes. *Sci. Transl. Med.* 2021;13 doi: 10.1126/scitranslmed.abg4535. [DOI] [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar].
- Guthmiller JJ., Lan L.Y., Fernandez-Quintero M.L., Han J., Utset H.A., Bitar D.J., Hamel N.J., Stovicek O., Li L., Tepora M., et al. Polyreactive Broadly Neutralizing B cells Are Selected to Provide Defense against Pandemic Threat Influenza Viruses. *Immunity*. 2020;53:1230–1244 e1235. doi: 10.1016/j.immuni.2020.10.005. [DOI] [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar].
- Guthmiller JJ, Utset HA, Wilson PC. B Cell Responses against Influenza Viruses: Short-Lived Humoral Immunity against a Life-Long Threat. *Viruses*. 2021 May 22;13(6):965. doi: 10.3390/v13060965. PMID: 34067435; PMCID: PMC8224597.
- Hale B.G., Randall R.E., Ortin J., Jackson D. The multifunctional NS1 protein of influenza A viruses. *J. Gen. Virol.* 2008;89:2359–2376. doi: 10.1099/vir.0.2008/004606-0. [DOI] [PubMed] [Google Scholar][Ref list].
- Hale, B. G. (2014). Conformational plasticity of the influenza a virus NS1 protein. *J. Gen. Virol.* 95 (Pt 10), 2099–2105. doi: 10.1099/vir.0.066282-0.

- Hammarlund E, Thomas A, Amanna IJ, et al. Plasma cell survival in the absence of B cell memory. *Nat Commun* 2017;8:1781. [DOI] [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar].
- Han Q, Chang C, Li L, Klenk C, Cheng J, Chen Y, Xia N, Shu Y, Chen Z, Gabriel G, Sun B, Xu K. 2014. Sumoylation of influenza A virus nucleoprotein is essential for intracellular trafficking and virus growth. *J Virol* 88:9379–9390. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.00509-14>.
- Hargreaves DC, Hyman PL, Lu TT, Ngo VN, Bidgol A, Suzuki G, Zou YR, Littman DR, and Cyster JG 2001. A coordinated change in chemokine responsiveness guides plasma cell movements. *J Exp Med* 194: 45–56. [DOI] [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar][Ref list].
- Hashimoto, Y., Moki, T., Takizawa, T., Shiratsuchi, A. and Nakanishi, Y. Evidence for phagocytosis of influenza virus-infected, apoptotic cells by neutrophils and macrophages in mice. *J. Immunol.* 2007. 178: 2448–2457.
- Hatta M, Kawaoka Y. La proteína NB del virus de la influenza B no es necesaria para la replicación del virus in vitro. *J Virol.* 2003 May;77(10):6050–4. doi: 10.1128/JVI.77.10.6050-6054.2003. [DOI] [Artículo gratuito de PMC] [PubMed] [Google Scholar].
- Herb, J., Curotto de Lafaille, M. Pre-existing antibody allows for maturation of new B cells in ‘recall’ germinal centres. *Nat Rev Immunol* 24, 234 (2024). <https://doi.org/10.1038/s41577-024-01012-w>.
- Henry C., Palm A.E., Utset H.A., Huang M., Ho I.Y., Zheng N.Y., Fitzgerald T., Neu K.E., Chen Y.Q., Krammer F., et al. Monoclonal Antibody Responses after Recombinant Hemagglutinin Vaccine versus Subunit Inactivated Influenza Virus Vaccine: A Comparative Study. *J. Virol.* 2019;93 doi: 10.1128/JVI.01150-19. [DOI] [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar].
- Henry C., Zheng N.Y., Huang M., Cabanov A., Rojas K.T., Kaur K., Andrews S.F., Palm A.E., Chen Y.Q., Li Y., et al. Influenza Virus Vaccination Elicits Poorly Adapted B Cell Responses in Elderly Individuals. *Cell Host Microbe.* 2019;25:357–366 e356. doi: 10.1016/j.chom.2019.01.002. [DOI] [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar].
- Herfst S, Schrauwen EJ, Linster M, Chutinimitkul S, de Wit E, Munster VJ, Sorrell EM, Bestebroer TM, Burke DF, Smith DJ, Rimmelzwaan GF, Osterhaus AD, Fouchier RA. Airborne transmission of influenza A/H5N1 virus between ferrets. *Science.* 2012 Jun 22;336(6088):1534–41. doi: 10.1126/science.1213362. PMID: 22723413; PMCID: PMC4810786.
- Hernandez Magdaleno A. Estudio de la patogenia del virus de Influenza Aviar (H5N2) altamente patógeno mediante inmunohistoquímica. Tesis para obtener el grado de Maestro en Ciencias Veterinarias Aves, otorgado por la Fac, de Medicina veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México 1998.
- Hinshaw VS, Bean WJ, Geraci J, Fiorelli P, Early G, Webster RG. Characterization of two influenza A viruses from a pilot whale. *J Virol.* 1986 May;58(2):655–6. doi: 10.1128/JVI.58.2.655-656.1986. PMID: 3701925; PMCID: PMC252957.
- Ho LP, Denney L, Luhn K, Teoh D, Clelland C, McMichael AJ. Activation of invariant NKT cells enhances the innate immune response and improves the disease course in influenza A virus infection. *Eur J Immunol.* 2008 Jul;38(7):1913–22. doi: 10.1002/eji.200738017. PMID: 18521958.
- Horvath CM, Williams MA, Cordero RA. Traducción acoplada eucariota de cistrones en tándem: identificación del polipéptido BM2 del virus de la gripe B. *EMBO J.* 1990 Ago;9(8):2639–47. doi: 10.1002/j.1460-2075.1990.tb07446.x. [DOI] [Artículo gratuito de PMC] [PubMed] [Google Scholar].
- Hu J., Zhang L., Liu X. Role of post-translational modifications in influenza a virus life cycle and host innate immune response. *Front. Microbiol.* 2020;11:517–561. doi: 10.3389/fmicb.2020.517461. [DOI] [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar].
- Huang KY, Rijal P, Schimanski L, Powell TJ, Lin TY, McCauley JW, Daniels RS, Townsend AR. 2015. Focused antibody response to influenza linked to antigenic drift. *Journal of Clinical Investigation* 125:2631–2645. DOI: <https://doi.org/10.1172/JCI81104>, PMID: 26011643.
- Huang SS, Banner D, Paquette SG, Leon AJ, Kelvin AA, Kelvin DJ. Pathogenic influenza B virus in the ferret model establishes lower respiratory tract infection. *J Gen Virol.* 2014;95:2127–39. doi: 10.1099/vir.0.064352-0. PMID:24989173 [DOI] [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar].
- Huo, C.; Yi Jin, Shumei Zou, Peng Qi, Jin Xiao, Haiyan Tian, Ming Wang, Yanxin Hu, Lethal influenza A virus preferentially activates TLR3 and triggers a severe inflammatory response, *Virus Research*, Volume 257, 2018, Pages 102–112, ISSN 0168-1702, <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2018.09.012>. (<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168170218302156>).
- Husain, M. Influenza Virus Host Restriction Factors: The ISGs and Non-ISGs. *Pathogens* 2024, 13, 127. <https://doi.org/10.3390/pathogens13020127>.
- Impagliazzo A., Milder F., Kuipers H., Wagner M.V., Zhu X., Hoffman R.M., van Meersbergen R., Huizingh J., Wanningen P., Verspuij J., et al. A stable trimeric influenza hemagglutinin stem as a broadly protective immunogen. *Science.* 2015;349:1301–1306. doi: 10.1126/science.aac7263. [DOI] [PubMed] [Google Scholar].

- Iwasaki A, Pillai PS. Innate immunity to influenza virus infection. *Nat Rev Immunol*. 2014; 14(5): 315–328.
- Janssens Y, Joye J, Waerlop G, Clement F, Leroux-Roels G, Leroux-Roels I. The role of cell-mediated immunity against influenza and its implications for vaccine evaluation. *Front Immunol*. 2022 Aug 16;13:959379. doi: 10.3389/fimmu.2022.959379. PMID: 36052083; PMCID: PMC9424642.
- Jegaskanda, S., Laurie, K. L., Amarasena, T. H., Winnall, W. R., Kramski, M., de Rose, R., et al. (2013b). Age-associated cross-reactive antibody-dependent cellular cytotoxicity toward 2009 pandemic influenza A virus subtype H1N1. *J. Infect. Dis.* 208, 1051–1061. doi: 10.1093/infdis/jit294.
- Jegaskanda, S., Vandenberg, K., Laurie, K. L., Loh, L., Kramski, M., Winnall, W. R., et al. (2014). Cross-reactive influenza-specific antibody-dependent cellular cytotoxicity in intravenous immunoglobulin as a potential therapeutic against emerging influenza viruses. *J. Infect. Dis.* 210, 1811–1822. doi: 10.1093/infdis/jiu334.
- Jegaskanda, S., Weinfurter, J. T., Friedrich, T. C., and Kent, S. J. (2013c). Antibody-dependent cellular cytotoxicity is associated with control of pandemic H1N1 influenza virus infection of macaques. *J. Virol.* 87, 5512–5522. doi: 10.1128/JVI.03030-12.
- Jiang Q.X., Chen Z.J. Structural insights into the activation of RIG-I, a nanosensor for viral RNAs. *EMBO Rep.* 2011;13:7–8. doi: 10.1038/embor.2011.239. [DOI] [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar].
- Jiang W, Chen H, Ren H, Huang X, Wang G, Chen Z, Chen L, Chen Z, Zhou P. Heterologous DNA virus-like –particle prime-boost vaccine elicits broad protection against both Group 1 ad 2 influenza A viruses. *J. Virol.* 2017;91:e02052–16. doi: 10.1128/JVI.02052-16. PMID:28179535 [DOI] [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar][Ref list].
- Jiang Y, Cai L, Jia S, Xie W, Wang X, Li J, Cui W, Li G, Xia X, Tang L. Guanylate-binding protein 1 inhibits inflammatory factors produced by H5N1 virus through its GTPase activity. *Poult Sci.* 2024 Jul;103(7):103800. doi: 10.1016/j.psj.2024.103800. Epub 2024 Apr 30. PMID: 38743966; PMCID: PMC11108968.
- Jinfang Xu, Ping Qian, Qunfeng Wu, Shasha Liu, Wenchun Fan, Keshan Zhang, Rong Wang, Huawei Zhang, Huanchun Chen, Xiangmin Li, Swine interferon-induced transmembrane protein, sIFITM3, inhibits foot-and-mouth disease virus infection in vitro and in vivo, *Antiviral Research*, Volume 109,2014, Pages 22-29, ISSN 0166-3542.
- Jinyan Shen, Hong Zhang, Xiaohong Sun, Yaping Zhang, Mengjing Wang, Mengdi Guan, Lili Liu, Wenxi Li, Hongke Xu, Yujiao Xie, Anran Ren, Fengyang Cao, Wenqiang Liu, Guohua Deng, Jing Guo & Xuyong Li. (2024) [Evolution and biological characteristics of H11 avian influenza viruses isolated from migratory birds and pigeons](#). *Emerging Microbes & Infections* 13:1.
- Ju C.H., Blum L.K., Kongpachith S., Lingampalli N., Mao R., Brodin P., Dekker C.L., Davis M.M., Robinson W.H. Plasmablast antibody repertoires in elderly influenza vaccine responders exhibit restricted diversity but increased breadth of binding across influenza strains. *Clin. Immunol.* 2018;193:70–79. doi: 10.1016/j.clim.2018.01.011. [DOI] [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar].
- Jureka A.S., Kleinpeter A.B., Cornilescu G., Cornilescu C.C., Petit C.M. Structural basis for a novel interaction between the NS1 protein derived from the 1918 influenza virus and RIG-I. *Structure*. 2015;23:2001–2010. doi: 10.1016/j.str.2015.08.007. [DOI] [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar].
- Jureka A.S., Kleinpeter A.B., Tipper J.L., Harrod K.S., Petit C.M. The influenza NS1 protein modulates RIG-I activation via a strain-specific direct interaction with the second CARD of RIG-I. *J. Biol. Chem.* 2020;295:1153–1164. doi: 10.1016/S0021-9258(17)49923-6. [DOI] [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar].
- Kanekiyo M, Gillespie RA, Cooper K, Canedo VG, Castanha PMS, Pegu A, Yang ES, Treaster L, Yun G, Wallace M, Kettenburg G, Williams C, Lundy J, Barrick S, O'Malley K, Midgett M, Marti MM, Chavva H, Corry J, Treat BR, Lipinski A, Batsche LO, Creanga A, Ritter I, Walker R, Olsen E, Laughlin A, Perez DR, Mascola JR, Boritz EA, Loo YM, Blair W, Esser M, Graham BS, Reed DS, Barratt-Boyes SM. Pre-exposure antibody prophylaxis protects macaques from severe influenza. *Science*. 2025 Jan 31;387(6733):534-541. doi: 10.1126/science.ado6481. Epub 2025 Jan 30. PMID: 39883776.
- Kanekiyo M., Joyce M.G., Gillespie R.A., Gallagher J.R., Andrews S.F., Yassine H.M., Wheatley A.K., Fisher B.E., Ambrozak D.R., Creanga A., et al. Mosaic nanoparticle display of diverse influenza virus hemagglutinins elicits broad B cell responses. *Nat. Immunol.* 2019;20:362–372. doi: 10.1038/s41590-018-0305-x. [DOI] [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar].
- Karim M., Biquand E., Declercq M., Jacob Y., van der Werf S., Demeret C. Nonproteolytic K29-linked ubiquitination of the PB2 replication protein of influenza A viruses by proviral cullin 4-based E3 ligases. *mBio*. 2020;11:e00305-20. doi: 10.1128/mBio.00305-20. [DOI] [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar].
- Katkere B., Rosa S., Drake J.R. The Syk-binding ubiquitin ligase c-Cbl mediates signaling-dependent B cell receptor ubiquitination and B cell receptor-mediated antigen processing and presentation. *J. Biol. Chem.* 2012;287:16636–16644. doi: 10.1074/jbc.M112.357640. [DOI] [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar].

- KEAWCHAROEN, J.; ORAVEERAKUL, K.; KUIKEN, T.; FOUCHIER, R. A.; AMONSIN, A.; PAYUNGPORN, S.; NOPPORNANTH, S.; WATTANODORN, S.; THEAMBOONIER, A.; TANTILERTCHAROEN, R.; PATTANARANGSAN, R.; ARYA, N.; RATANAKORN, P.; OSTERHAUS, D. M.; POOVORAWAN, Y. (2004): Avian influenza H5N1 in tigers and leopards. *Emerg Infect Dis*. 10: 2189-91.
- Kessler, S., Burke, B., Andrieux, G. *et al.* Deciphering bat influenza H18N11 infection dynamics in male Jamaican fruit bats on a single-cell level. *Nat Commun* 15, 4500 (2024). <https://doi.org/10.1038/s41467-024-48934-6>.
- Khurana S., Hahn M., Coyle E.M., King L.R., Lin T.L., Treanor J., Sant A., Golding H. Repeat vaccination reduces antibody affinity maturation across different influenza vaccine platforms in humans. *Nat. Commun.* 2019;10:3338. doi: 10.1038/s41467-019-11296-5. [DOI] [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar].
- Kilbourne ED. 2006. Influenza pandemics of the 20th century. *Emerg Infect Dis* 12:9–14. <https://doi.org/10.3201/eid1201.051254>.
- Kim Y.M., Pan J.Y., Korb G.A., Peperzak V., Boes M., Ploegh H.L. Monovalent ligation of the B cell receptor induces receptor activation but fails to promote antigen presentation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2006;103:3327–3332. doi: 10.1073/pnas.0511315103. [DOI] [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar].
- Kirui J., Mondal A., Mehle A. Ubiquitination upregulates influenza virus polymerase function. *J. Virol.* 2016;90:10906–10914. doi: 10.1128/JVI.01829-16. [DOI] [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar].
- Kiss I, Gyarmati P, Zohari S, Ramsay KW, Metreveli G, Weiss E, et al. Molecular characterization of highly pathogenic H5N1 avian influenza viruses isolated in Sweden in 2006. *Virol J.* 2008;5(1):113. 10.1186/1743-422X-5-113 [DOI] [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar].
- Klein, S.; Golani, G.; Lolicato, F.; Lahr, C.; Beyer, D.; Herrmann, A.; Wachsmuth-Melm, M.; Reddmann, N.; Brecht, R.; Hosseinzadeh, M.; et al. IFITM3 blocks influenza virus entry by sorting lipids and stabilizing hemifusion. *Cell Host Microbe* 2023, 31, 616–633.e20. [Google Scholar] [CrossRef].
- Knobil, Role of oxidants in influenza virus-induced gene expression, *Am J Physiol*, № 274, c. 134.
- Koel BF, Burke DF, Bestebroer TM, van der Vliet S, Zondag GC, Vervaeke G, Skepner E, Lewis NS, Spronken MI, Russell CA, Eropkin MY, Hurt AC, Barr IG, de Jong JC, Rimmelzwaan GF, Osterhaus AD, Fouchier RA, Smith DJ. 2013. Substitutions near the receptor binding site determine major antigenic change during influenza virus evolution. *Science* 342:976–979. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.1244730>, PMID: 24264991.
- Kok W.L., Denney L., Benam K., Cole S., Clelland C., McMichael A.J., Ho L.-P. Pivotal Advance: Invariant NKT cells reduce accumulation of inflammatory monocytes in the lungs and decrease immune-pathology during severe influenza A virus infection. *J. Leukoc. Biol. USA*. 2011;91:357–368. doi: 10.1189/jlb.0411184. [DOI] [PubMed] [Google Scholar].
- Koliopoulos M.G., Lethier M., van der Veen A.G., Haubrich K., Hennig J., Kowalinski E., Stevens R.V., Martin S.R., Reis e Sousa C., Cusack S., et al. Molecular mechanism of influenza A NS1-mediated TRIM25 recognition and inhibition. *Nat. Commun.* 2018;9:1820. doi: 10.1038/s41467-018-04214-8. [DOI] [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar].
- Komander D, Rape M. 2012. The ubiquitin code. *Annu Rev Biochem* 81: 203–229. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-biochem-060310-170328>.
- Kosik I., Praznovska M., Kosikova M., Bobisova Z., Holly J., Vareckova E., Kostolansky F., Russ G. The ubiquitination of the influenza A virus PB1-F2 protein is crucial for its biological function. *PLoS ONE*. 2015;10:e0118477. doi: 10.1371/journal.pone.0118477. [DOI] [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar].
- Koutsakos M, Nguyen TH, Barclay WS, Kedzierska K. Knows and unknowns of influenza B. *Future Microbiol* 2016; 11:119-35. doi: 10.2217/fmb.15.120. [DOI] [PubMed] [Google Scholar].
- Krammer F, Palese P. Orthomyxoviridae: the viruses and their replication. En: Howley PM, Knipe DM (eds.). *Fields Virology* (Vol.1)(7th edition). Wolters Kluwer, Philadelphia. 2021, p.596-648. [Google Scholar].
- Krammer, F. The human antibody response to influenza A virus infection and vaccination. *Nat Rev Immunol* 19, 383–397 (2019). <https://doi.org/10.1038/s41577-019-0143-6>.
- Krug R.M. Functions of the influenza A virus NS1 protein in antiviral defense. *Curr. Opin. Virol.* 2015;12:1–6. doi: 10.1016/j.coviro.2015.01.007. [DOI] [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar] [Ref list].
- Kuiken T, Holmes EC, McCauley J, Rimmelzwaan GF, Williams C.S., Grenfell B.T. Host species barriers to Influenza Virus Infections. *Science* 2006;312:4-13.
- Kulkarni R.R., Haeryfar S.M., Sharif S. The invariant NKT cell subset in anti-viral defenses: A dark horse in anti-influenza immunity? *J. Leukoc. Biol.* 2010;88:635–643. doi: 10.1189/jlb.0410191. [DOI] [PubMed] [Google Scholar].
- Kunkeaw, N.; Jeon, S.H.; Lee, K.; Johnson, B.H.; Tanasanvimon, S.; Javle, M.; Pairojkul, C.; Chamgramol, Y.; Wongfieng, W.; Gong, B.; et al. Cell death/proliferation roles for nc886, a non-coding RNA, in the protein kinase R pathway in cholangiocarcinoma. *Oncogene* 2013, 32, 3722–3731. [CrossRef] [PubMed].

- Kunkel EJ, Campbell JJ, Haraldsen G, Pan J, Boisvert J, Roberts AI, Ebert EC, Vierra MA, Goodman SB, Genovese MC, Wardlaw AJ, Greenberg HB, Parker CM, Butcher EC, Andrew DP, and Agace WW 2000. Lymphocyte CC chemokine receptor 9 and epithelial thymus-expressed chemokine (TECK) expression distinguish the small intestinal immune compartment: Epithelial expression of tissue-specific chemokines as an organizing principle in regional immunity. *J Exp Med* 192: 761–768. [DOI] [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar][Ref list].
- Kuraoka M., Schmidt A.G., Nojima T., Feng F., Watanabe A., Kitamura D., Harrison S.C., Kepler T.B., Kelsoe G. Complex Antigens Drive Permissive Clonal Selection in Germinal Centers. *Immunity*. 2016;44:542–552. doi: 10.1016/j.immuni.2016.02.010. [DOI] [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar].
- Kwon, T., Trujillo, J. D., Carossino, M., Lyoo, E. L., McDowell, C. D., Cool, K., .. Richt, J. A. (2024) Los cerdos son altamente susceptibles, pero no transmiten, el virus de la gripe aviar altamente patógena derivado del visón H5N1 clado 2.3.4.4b. *Microbios emergentes e infecciones*, 13(1). <https://doi.org/10.1080/22221751.2024.2353292>.
- Labrie J.E., 3rd, Sah A.P., Allman D.M., Cancro M.P., Gerstein R.M. Bone marrow microenvironmental changes underlie reduced RAG-mediated recombination and B cell generation in aged mice. *J. Exp. Med.* 2004;200:411–423. doi: 10.1084/jem.20040845. [DOI] [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar].
- Lakdawala SS, Jayaraman A, Halpin RA, Lamirande EW, Shih AR, Stockwell TB, Lin X, Simenauer A, Hanson CT, Vogel L, et al. El paladar blando es un sitio importante de adaptación para los virus de la gripe transmisibles. *Naturaleza*. 2015;526:122-5. doi: 10.1038/nature15379. PMID:26416728 [DOI] [Artículo gratuito de PMC] [PubMed] [Google Scholar][Lista de referencias].
- Lamb RA, Choppin PW, Chanock RM, Lai CJ. Mapeo de los dos genes superpuestos para los polipéptidos NS1 y NS2 en el segmento 8 de ARN del genoma del virus de la gripe. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1980 Abr;77(4):1857–61. doi: 10.1073/pnas.77.4.1857. [DOI] [Artículo gratuito de PMC] [PubMed] [Google Scholar][Lista de referencias].
- Lamotte L.A., Tafforeau L. How influenza A virus NS1 deals with the ubiquitin system to evade innate immunity. *Viruses*. 2021;13:2309. doi: 10.3390/v13112309. [DOI] [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar].
- Lares, MR; John J. Rossi, Dominique L. Ouellet, RNAi and small interfering RNAs in human disease therapeutic applications, *Trends in Biotechnology*, Volume 28, Issue 11, 2010, Pages 570-579,ISSN 0167-7799, <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2010.07.009>.
- Lawrence, C. W., and Braciale, T. J. (2004). Activation, differentiation, and migration of naive virus-specific CD8+ T cells during pulmonary influenza virus infection. *J. Immunol.* 173, 1209–1218. doi: 10.4049/jimmunol.173.2.1209.
- Lebacqz-Verheyden, A. M., Vaerman, J. P. & Heremans, J. F. (1972). A possible homologue of mammalian IgA in chicken serum and secretions. *Immunology* 22: 165-175.
- Leddon S.A., Richards K.A., Treanor J.J., Sant A.J. Abundance and specificity of influenza reactive circulating memory follicular helper and non-follicular helper CD4 T cells in healthy adults. *Immunology*. 2015;146:157–162. doi: 10.1111/imm.12491. [DOI] [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar].
- Lee BW, Bey RF, Baarsch MJ, Larson ME. Class specific antibody response to influenza A H1N1 infection in swine. *Vet Microbiol.* 1995 Feb;43(2-3):241-50. doi: 10.1016/0378-1135(94)00099-i. PMID: 7740762.
- Lee J, Boutz DR, Chromikova V, Joyce MG, Vollmers C, Leung K, Horton AP, DeKosky BJ, Lee CH, Lavinder JJ, Murrin EM, Chrysostomou C, Hoi KH, Tsybovsky Y, Thomas PV, Druz A, Zhang B, Zhang Y, Wang L, Kong WP, et al. 2016. Molecular-level analysis of the serum antibody repertoire in young adults before and after seasonal influenza vaccination. *Nature Medicine* 22:1456–1464. DOI: <https://doi.org/10.1038/nm.4224>, PMID: 27820605.
- Lee J, Paparoditis P, Horton AP, Fruhwirth A, McDaniel JR, Jung J, Boutz DR, Hussein DA, Tanno Y, Pappas L, Ippolito GC, Corti D, Lanzavecchia A, Georgiou G. 2019. Persistent antibody clonotypes dominate the serum response to influenza over multiple years and repeated vaccinations. *Cell Host & Microbe* 25:367–376.DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chom.2019.01.010>, PMID: 30795981.
- Lee JM, Bloom JD. 2019. Computer code for “mapping person-to-person variation in viral mutations that escape polyclonal immunity to influenza hemagglutinin”. GitHub. [https://github.com/jbloomlab/map\\_flu\\_serum\\_Perth2009\\_H3\\_HA](https://github.com/jbloomlab/map_flu_serum_Perth2009_H3_HA).
- Lee, L. Y.-H., Ha, D. L. A., Simmons, C., de Jong, M. D., Chau, N. V. V., Schumacher, R., et al. (2008). Memory T cells established by seasonal human influenza A infection cross-react with avian influenza A (H5N1) in healthy individuals. *J. Clin. Invest.* 118, 3478–3490. doi: 10.1172/JCI32460.
- Legge, K. L., and Braciale, T. J. (2003). Accelerated migration of respiratory dendritic cells to the regional lymph nodes is limited to the early phase of pulmonary infection. *Immunity* 18, 265–277. doi: 10.1016/S1074-7613(03)00023-2.
- Leguia, M., Garcia-Glaessner, A., Muñoz-Saavedra, B. et al. Highly pathogenic avian influenza A (H5N1) in marine mammals and seabirds in Peru. *Nat Commun* 14, 5489 (2023). <https://doi.org/10.1038/s41467-023-41182-0>.

- Lewnard, J.A.; Cobey, S. Immune History and Influenza Vaccine Effectiveness. *Vaccines* 2018, 6, 28. [Google Scholar] [Cross-Ref] [PubMed] [Green Version].
- Lewis NS, Russell CA, Langat P, Anderson TK, Berger K, Bielejec F, Burke DF, Dudas G, Fonville JM, Fouchier RA, Kellam P, Koel BF, Lemey P, Nguyen T, Nuansrichy B, Peiris JM, Saito T, Simon G, Skepner E, Takemae N, consortium E, Webby RJ, Van Reeth K, Brookes SM, Larsen L, Watson SJ, Brown IH, Vincent AL, ESNIP3 Consortium . 2016. The global antigenic diversity of swine influenza A viruses. *Elife* 5:e12217. 10.7554/eLife.12217. [DOI] [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar][Ref list].
- Leymarie O., Jouvion G., Hervé P.L., Chevalier C., Lorin V., Lecardonnel J., Da Costa B.,.
- Li HP, Chen PG, Liu FT, Zhu HS, Jiao XQ, Zhong K, Guo YJ, Zha GM, Han LQ, Lu WF, Wang YY, Yang GY. (2017). Characterization and anti-inflammation role of swine IFITM3 gene. *Oncotarget*. 2017 Aug 27;8(43):73579-73589. doi: 10.18632/oncotarget.20568. PMID: 29088728; PMCID: PMC5650283.
- Li LF, Yu J, Li Y, Wang J, Li S, Zhang L, Xia SL, Yang Q, Wang X, Yu S, Luo Y, Sun Y, Zhu Y, Munir M, Qiu HJ. Guanylate-Binding Protein 1, an Interferon-Induced GTPase, Exerts an Antiviral Activity against Classical Swine Fever Virus Depending on Its GTPase Activity. *J Virol*. 2016 Apr 14;90(9):4412-4426. doi: 10.1128/JVI.02718-15. PMID: 26889038; PMCID: PMC4836331.
- Li Y, Li Z, Zhao Y, Chen X. Potentiation of Recombinant NP and M1-Induced Cellular Immune Responses and Protection by Physical Radiofrequency Adjuvant. *Vaccines (Basel)*. 2021 Nov 24;9(12):1382. doi: 10.3390/vaccines9121382. PMID: 34960128; PMCID: PMC8706500.
- Li Y, Myers JL, Bostick DL, Sullivan CB, Madara J, Linderman SL, Liu Q, Carter DM, Wrammert J, Esposito S, Principi N, Plotkin JB, Ross TM, Ahmed R, Wilson PC, Hensley SE. 2013. Immune history shapes specificity of pandemic H1N1 influenza antibody responses. *The Journal of Experimental Medicine* 210:1493–1500. DOI: <https://doi.org/10.1084/jem.20130212>, PMID: 23857983.
- Li Z., Chao T.C., Chang K.Y., Lin N., Patil V.S., Shimizu C., Head S.R., Burns J.C., Rana T.M. The long noncoding RNA THRIL regulates TNF $\alpha$  expression through its interaction with hnRNPL. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2014;111:1002–1007. doi: 10.1073/pnas.1313768111.[DOI] [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar].
- Li, T., Wang, J., Wang, Y., Chen, Y., Wei, H., Sun, R., et al. (2017). Respiratory influenza virus infection induces memory-like liver NK cells in mice. *J. Immunol.* 198, 1242–1252. doi: 10.4049/jimmunol.1502186.
- Li, Y; Zhou, H; Wen, Z; Wu, S; Huang, C; Jia, G; Chen, H; Jin, M. (2011). Transcription analysis on response of swine lung to H1N1 swine influenza virus. *BMC Genomics* 12:398. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2164-12-398>.
- Li, Y., Yamakita, Y., Krug, R. M. (1998). Regulation of a nuclear export signal by an adjacent inhibitory sequence: the effector domain of the influenza virus NS1 protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95 (9), 4864–4869. doi: 10.1073/pnas.95.9.4864.
- Liang F, Lindgren G, Sandgren K.J., Thompson E.A., Francica J.R., Seubert A., De Gregorio E., Barnett S., O'Hagan D.T., Sullivan N.J., et al. Vaccine priming is restricted to draining lymph nodes and controlled by adjuvant-mediated antigen uptake. *Sci. Transl. Med.* 2017;9 doi: 10.1126/scitranslmed.aal2094. [DOI] [PubMed] [Google Scholar].
- Liao T.L., Wu C.Y., Su W.C., Jeng K.S., Lai M.M. Ubiquitination and deubiquitination of NP protein regulates influenza A virus RNA replication. *EMBO J.* 2010; 29:3879–3890. doi: 10.1038/emboj.2010.250. [DOI] [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar].
- Liedmann S., Hrinicius E.R., Guy C., Anhlán D., Dierkes R., Carter R., Wu G., Staeheli P., Green D.R., Wolff T., et al. Viral suppressors of the RIG-I-mediated interferon response are pre-packaged in influenza virions. *Nat. Commun.* 2014;5:5645. doi: 10.1038/ncomms6645. [DOI] [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar][Ref list].
- Lin CY, Shih MC, Chang HC, Lin KJ, Chen LF, Huang SW, Yang ML, Ma SK, Shiao AL, Wang JR, Chen KR, Ling P. Influenza A virus NS1 resembles a TRAF3-interacting motif to target the RNA sensing-TRAF3-type I IFN axis and impair antiviral innate immunity. *J Biomed Sci.* 2021 Oct 5;28(1):66. doi: 10.1186/s12929-021-00764-0. PMID: 34610835; .
- Lin Y.C., Jeng K.S., Lai M.M.C. CNOT4-mediated ubiquitination of influenza A virus nucleoprotein promotes viral RNA replication. *mBio*. 2017; 8: e00597-17. doi: 10.1128/mBio.00597-17. [DOI] [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar].
- Linderman S.L., Hensley S.E. Antibodies with 'Original Antigenic Sin' Properties Are Valuable Components of Secondary Immune Responses to Influenza Viruses. *PLoS Pathog.* 2016;12:e1005806. doi: 10.1371/journal.ppat.1005806. [DOI] [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar].
- Linderman SL, Chambers BS, Zost SJ, Parkhouse K, Li Y, Herrmann C, Ellebedy AH, Carter DM, Andrews SF, Zheng N-Y. 2014. Potential antigenic explanation for atypical h1n1 infections among middle-aged adults during the 2013–2014 influenza season. *PNAS* 115. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.1409171111>.

- Lindh, E.; H. Lounela, N. Ikonen, T. Kantala, C. Savolainen-Kopra, A. Kauppinen, P. Österlund, L. Kareinen, A. Katz, T. Nokireki, J. Jalava, L. London, M. Pitkäpaasi, J. Vuolle, A.-L. Punto-Luoma, R. Kaarto, L. Voutilainen, R. Holopainen, L. Kalin-Mänttari, T. Laaksonen, H. Kiviranta, A. Pennanen, O. Helve, I. Laamanen, M. Melin, N. Tammiranta, R. Rimhanen-Finne, T. Gadd, M. Salminen, Highly pathogenic avian influenza A(H5N1) virus infection on multiple fur farms in the South and Central Ostrobothnia regions of Finland, July 2023. *Euro Surveill.* 28 (2023).
- Liniger, M., Summerfield, A., Zimmer, G., McCullough, K. C., & Ruggli, N. (2012). Chicken cells sense influenza A virus infection through MDA5 and CARDIF signaling involving LGP2. *J Virol*, 86(2), 705-717. doi:10.1128/JVI.00742-11.
- Liu C.H., Zhou L., Chen G., Krug R.M. Battle between influenza A virus and a newly identified antiviral activity of the PARP-containing ZAPL protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2015;112:14048–14053. doi: 10.1073/pnas.1509745112. [DOI] [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar].
- Liu J,Xiao H,Lei F,Zhu Q,Qin K,Zang X-W et al.Highly Pathogenic H5N1Influenza Virus Infection in Migratory Birds.2005;- *Science* 309:1206. .
- Liu Q, Zheng X., Zhang C., Shao X., Zhang X., Zhang Q., Jiang X. Conjugating influenza a (H1N1) antigen to n-trimethylaminoethylmethacrylate chitosan nanoparticles improve the immunogenicity of the antigen after nasal administration. *J. Med. Virol.* 2015;87:1807–1815. doi: 10.1002/jmv.24253. [DOI] [PubMed] [Google Scholar].
- Liu X, Xu F, Ren L, Zhao F, Huang Y, Wei L, et al. MARCH8 inhibits influenza A virus infection by targeting viral M2 protein for ubiquitination-dependent degradation in lysosomes. *Nat Commun.* 2021; 12(1):4427. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-24724-2> PMID: 34285233.
- Liu X., Zhao Z., Xu C., Sun L., Chen J., Zhang L., Liu W. Cyclophilin A restricts influenza A virus replication through degradation of the M1 protein. *PLoS ONE.* 2012; 7: e31063. doi: 10.1371/journal.pone.0031063. [DOI] [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar] Liu C.H., Zhou L., Chen G., Krug R.M. Battle between influenza A virus and a newly.
- Liu Y.J., Joshua D.E., Williams G.T., Smith C.A., Gordon J., MacLennan I.C. Mechanism of antigen-driven selection in germinal centres. *Nature.* 1989;342:929–931. doi: 10.1038/342929a0. [DOI] [PubMed] [Google Scholar].
- López, FR. (2024) <https://www.animalshealth.es/profesionales/veterinarios-describen-caso-gripe-aviar-perro-sintomas-tracto-respiratorio>.
- Ludwig, S., Wang, X., Ehrhardt, C., Zheng, H., Donelan, N., Planz, O., et al. (2002). The influenza A virus NS1 protein inhibits activation of jun N-terminal kinase and AP-1 transcription factors. *J. Virol.* 76 (21), 11166–11171. doi: 10.1128/jvi.76.21.11166-11171.2002.
- Ly H. Highly pathogenic avian influenza H5N1 virus infections of dairy cattle and livestock handlers in the United States of America. *Virulence.* 2024 Dec;15(1):2343931. doi: 10.1080/21505594.2024.2343931. Epub 2024 Apr 17. PMID: 38632687; PMCID: PMC11028003.
- Ma J., Li S., Li K., Wang X., Li S. Effects of the PA-X and PB1-F2 proteins on the virulence of the 2009 pandemic H1N1 influenza A virus in mice. *Front. Cell Infect. Microbiol.* 2019; 9:315.doi: 10.3389/fcimb.2019.00315. [DOI] [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar].
- Ma Y, Ouyang J, Wei J, Maarouf M, Chen JL. Involvement of Host Non-Coding RNAs in the Pathogenesis of the Influenza Virus. *Int J Mol Sci.* 2016 Dec 27;18(1):39. doi: 10.3390/ijms18010039. PMID: 28035991; PMCID: PMC5297674.
- Magor, K. E., Miranzo Navarro, D., Barber, M. R., Petkau, K., Fleming-Canepa, X., Blyth, G. A., & Blaine, A. H. (2013). Defense genes missing from the flight division. *Dev Comp Immunol*, 41(3), 377-388. doi:10.1016/j.dci.2013.04.010.
- Mallapaty S. Bird flu virus has been spreading among US cows for months, RNA reveals. *Nature.* 2024 Apr 27. doi: 10.1038/d41586-024-01256-5. Epub ahead of print. PMID: 38678111.
- Mänz B, Dornfeld D, Götz V, Zell R, Zimmermann P, et al. (2013) Pandemic Influenza A Viruses Escape from Restriction by Human MxA through Adaptive Mutations in the Nucleoprotein. *PLOS Pathogens* 9(3): e1003279. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003279>.
- Marc D. Influenza virus non-structural protein NS1: Interferon antagonism and beyond. *J. Gen. Virol.* 2014;95:2594–2611. doi: 10.1099/vir.0.069542-0. [DOI] [PubMed] [Google Scholar].
- Marc, D. (2014). Influenza virus non-structural protein NS1: interferon antagonism and beyond. *J. Gen. Virol.* 95 (Pt 12), 2594–2611. doi: 10.1099/vir.0.069542-0.
- Marques M., Ramos B., Soares A.R., Ribeiro D. Cellular proteostasis during influenza A virus infection-friend or foe? *Cells.* 2019;8:228. doi: 10.3390/cells8030228. [DOI] [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar].
- Mata M, Morcillo E, Gimeno C, and Cortijo J. N-acetyl-Lcysteine (NAC) inhibit mucin synthesis and pro-inflammatory mediators in alveolar type II epithelial cells infected with influenza virus A and B and with respiratory syncytial virus (RSV). *Biochem Pharmacol* 82: 548–555, 2011.

- Matsuda K., Migueles S.A., Huang J., Bolikhovitinov L., Stuccio S., Griesman T., Pullano A.A., Kang B.H., Ishida E., Zimmerman M., et al. A replication-competent adenovirus-vectored influenza vaccine induces durable systemic and mucosal immunity. *J. Clin. Investig.* 2021;131 doi: 10.1172/JCI140794. [DOI] [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar].
- Mayer C.T., Gazumyan A., Kara E.E., Gitlin A.D., Golijanin J., Viant C., Pai J., Oliveira T.Y., Wang Q., Escolano A., et al. The microanatomic segregation of selection by apoptosis in the germinal center. *Science*. 2017;358 doi: 10.1126/science.aao2602. [DOI] [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar].
- Mazur I., Anhlán D., Mitzner D., Wixler L., Schubert U., Ludwig S. The proapoptotic influenza A virus protein PB1-F2 regulates viral polymerase activity by interaction with the PB1 protein. *Cell Microbiol.* 2008;10:1140–1152. doi: 10.1111/j.1462-5822.2008.01116.x. [DOI] [PubMed] [Google Scholar].
- Mcauley J.L., Corcilius L., Tan H.X., Payne R.J., McGuckin M.A., Brown L.E. The cell surface mucin MUC1 limits the severity of influenza A virus infection. *Mucosal Immunol* (2017) 10(6):1581–93. 10.1038/mi.2017.16 [DOI] [PubMed] [Google Scholar].
- McCarthy K.R., Raymond D.D., Do K.T., Schmidt A.G., Harrison S.C. Affinity maturation in a human humoral response to influenza hemagglutinin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2019 doi: 10.1073/pnas.1915620116. [DOI] [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar].
- McCarthy K.R., Watanabe A., Kuraoka M., Do K.T., McGee C.E., Sempowski G.D., Kepler T.B., Schmidt A.G., Kelsoe G., Harrison S.C. Memory B Cells that Cross-React with Group 1 and Group 2 Influenza A Viruses Are Abundant in Adult Human Repertoires. *Immunity*. 2018;48:174–184 e179. doi: 10.1016/j.immuni.2017.12.009. [DOI] [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar].
- McMaster, S. R., Gabbard, J. D., Koutsouanos, D. G., Compans, R. W., Tripp, R. A., Tompkins, S. M., et al. (2015). Memory T cells generated by prior exposure to influenza cross react with the novel H7N9 influenza virus and confer protective heterosubtypic immunity. *PLoS ONE* 10:e0115725. doi: 10.1371/journal.pone.0115725.
- McNamara H.A., Idris A.H., Sutton H.J., Vistein R., Flynn B.J., Cai Y., Wiehe K., Lyke K.E., Chatterjee D., Kc N., et al. Antibody Feedback Limits the Expansion of B Cell Responses to Malaria Vaccination but Drives Diversification of the Humoral Response. *Cell Host Microbe*. 2020;28:572–585 e577. doi: 10.1016/j.chom.2020.07.001. [DOI] [PubMed] [Google Scholar].
- Megan E. Griffiths *et al.* Dynamics of influenza transmission in vampire bats revealed by longitudinal monitoring and a large-scale anthropogenic perturbation. *Sci. Adv.* 11, eads1267(2025). DOI:10.1126/sciadv.ads1267.
- Mehle A., McCullers J.A. 2013. Structure and function of the influenza virus replication machinery and PB1-F2, p 133–145. In Webster R.G., Monto A.S., Braciale T.J., Lamb R.A. (ed), *Textbook of influenza*, 2nd ed. John Wiley & Sons, Ltd, Oxford, United Kingdom.
- Mesin L., Schiepers A., Ersching J., Barbulescu A., Cavazzoni C.B., Angelini A., Okada T., Kurosaki T., Victora G.D. Restricted Clonality and Limited Germinal Center Reentry Characterize Memory B Cell Reactivation by Boosting. *Cell*. 2020;180:92–106 e111. doi: 10.1016/j.cell.2019.11.032. [DOI] [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar].
- Meurs, E.; Chong, K.; Galabru, J.; Thomas, N.S.; Kerr, I.M.; Williams, B.R.; Hovanessian, A.G. Molecular cloning and characterization of the human double-stranded RNA-activated protein kinase induced by interferon. *Cell* 1990, 62, 379–390. [CrossRef][PubMed].
- Mibayashi, M., Martinez-Sobrido, L., Loo, Y. M., Cardenas, W. B., Gale, M., Jr., Garcia-Sastre, A. (2007). Inhibition of retinoic acid-inducible gene I-mediated induction of beta interferon by the NS1 protein of influenza A virus. *J. Virol.* 81 (2), 514–524. doi: 10.1128/JVI.01265-06.
- Michel, M. L., Keller, A. C., Paget, C., Fujio, M., Trottein, F., Savage, P. B., Wong, C. H. et al., Identification of an IL-17-producing NK1.1(neg) iNKT cell population involved in airway neutrophilia. *J. Exp. Med.* 2007. 204: 995–1001.
- Mistry B, Long JS, Schreyer J, Staller E, Sanchez-David RY, Barclay WS. Elucidating the Interactions between Influenza Virus Polymerase and Host Factor ANP32A. *J Virol*. 2020 Jan 17;94(3):e01353-19. doi: 10.1128/JVI.01353-19. PMID: 31694956; PMCID: PMC7000967.
- Moghoofoei M, Monavari SH, Mostafaei S, et al. Prevalence of influenza A infection in the Middle-East: A systematic review and meta-analysis. *Clin Respir J*. 2018; 12(5): 1787–1801.
- Mondal A, Potts GK, Dawson AR, Coon JJ, Mehle A. 2015. Phosphorylation at the homotypic interface regulates nucleoprotein oligomerization and assembly of the influenza virus replication machinery. *PLoS Pathog* 11:e1004826. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1004826>.
- Monto, A.S.; Malosh, R.E.; Petrie, J.G.; Martin, E.T. The Doctrine of Original Antigenic Sin: Separating Good From Evil. *J. Infect. Dis.* 2017, 215, 1782–1788. [Google Scholar] [CrossRef] [Green Version].

- Moreira E.A., Yamauchi Y., Matthias P. How influenza virus uses host cell pathways during uncoating. *Cells*. 2021;10:1722. doi: 10.3390/cells10071722. [DOI] [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar].
- Moriyama, M., Chen, I. Y., Kawaguchi, A., Koshiba, T., Nagata, K., Takeyama, H., et al. (2016). The RNA- and TRIM25-binding domains of influenza virus NS1 protein are essential for suppression of NLRP3 inflammasome-mediated interleukin-1 $\beta$  secretion. *J. Virol.* 90 (8), 4105–4114. doi: 10.1128/JVI.00120-16.
- Munster VJ, Baas C, Lexmond P, Waldenstrom J, Wallensten A, Fransson T, Rimmelzwaan GF, Beyer WE, Schutten M, Olsen B, et al. Spatial, temporal, and species variation in prevalence of influenza A viruses in wild migratory birds. *PLoS Pathog.* 2007;3 (5):e61.
- Murawski, A., Fabrizio, T., Ossiboff, R. et al. Highly pathogenic avian influenza A(H5N1) virus in a common bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*) in Florida. *Commun Biol* 7, 476 (2024). <https://doi.org/10.1038/s42003-024-06173-x>.
- Nachbagauer R., Feser J., Naficy A., Bernstein D.I., Guptill J., Walter E.B., Berlanda-Scorza F., Stadlbauer D., Wilson P.C., Aydllo T., et al. A chimeric hemagglutinin-based universal influenza virus vaccine approach induces broad and long-lasting immunity in a randomized, placebo-controlled phase I trial. *Nat. Med.* 2021;27:106–114. doi: 10.1038/s41591-020-1118-7. [DOI] [PubMed] [Google Scholar].
- Nelson MI, Gramer MR, Vincent AL, Holmes EC. 2012. Global transmission of influenza viruses from humans to swine. *J Gen Virol* 93:2195–2203. 10.1099/vir.0.044974-0. [DOI] [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar][Ref list].
- Nelson, M., Viboud, C., Vincent, A. et al. Global migration of influenza A viruses in swine. *Nat Commun* 6, 6696 (2015). <https://doi.org/10.1038/ncomms7696>.
- Neumann G, Castrucci MR, Kawaoka Y. 1997. Nuclear import and export of influenza virus nucleoprotein. *J Virol* 71:9690–9700.
- Nguyen HH, Tumpey TM, Park HJ, Byun YH, Tran LD, et al. (2010) Prophylactic and Therapeutic Efficacy of Avian Antibodies Against Influenza Virus H5N1 and H1N1 in Mice. *PLOS ONE* 5(4): e10152. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010152>.
- Nguyen, T.; C. Hutter, A. Markin, M. N. Thomas, K. Lantz, M. L. Killian, G. M. Janzen, S. Vijendran, S. Wagle, B. Inderski, D. R. Magstadt, G. Li, D. G. Diel, E. A. Frye, K. M. Dimitrov, A. K. Swinford, A. C. Thompson, K. R. Snevik, D. L. Suarez, E. Spackman, S. M. Lakin, S. C. Ahola, K. R. Johnson, A. L. Baker, S. Robbe-Austerman, M. K. Torchetti, T. K. Anderson, Emergence and interstate spread of highly pathogenic avian influenza A(H5N1) in dairy cattle, *bioRxiv* (2024)p. 2024.05.01.591751.
- Nie Y, Waite J, Brewer F, Sunshine MJ, Littman DR, and Zou YR 2004. The role of CXCR4 in maintaining peripheral B cell compartments and humoral immunity. *J Exp Med* 200: 1145–1156. [DOI] [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar] [Ref list].
- Noah, D. L., Twu, K. Y., Krug, R. M. (2003). Cellular antiviral responses against influenza A virus are countered at the posttranscriptional level by the viral NS1A protein via its binding to a cellular protein required for the 3' end processing of cellular pre-mRNA. *Virology* 307 (2), 386–395. doi: 10.1016/s0042-6822(02)00127-7.
- Nogales A, DeDiego ML and Martinez-Sobrido L (2022) Live attenuated influenza A virus vaccines with modified NS1 proteins for veterinary use. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 12:954811. doi: 10.3389/fcimb.2022.954811.
- Nogales, A (2024). <https://www.csic.es/es/actualidad-del-csic/aitor-nogales-los-saltos-de-virus-de-gripe-entre-humanos-y-cerdos-no-son-eventos-extraordinarios>.
- Nogales, A., Martinez-Sobrido, L., Topham, D. J., DeDiego, M. L. (2017c). NS1 protein amino acid changes D189N and V194I affect interferon responses, thermosensitivity, and virulence of circulating H3N2 human influenza A viruses. *J. Virol.* 91 (5), e01930–16. doi: 10.1128/JVI.01930-16.
- Nogales, A., Martinez-Sobrido, L., Topham, D. J., DeDiego, M. L. (2018b). Modulation of innate immune responses by the influenza A NS1 and PA-X proteins. *Viruses* 10 (12), 708. doi: 10.3390/v10120708.
- Nordmann, A.; Wixler, L.; Boergeling, Y.; Wixler, V.; Ludwig, S. A new splice variant of the human guanylate-binding protein 3 mediates anti-influenza activity through inhibition of viral transcription and replication. *FASEB J.* 2012, 26, 1290–1300. [Google Scholar] [CrossRef].
- Nucifora F.C., Jr., Nucifora L.G., Ng C.H., Arbez N., Guo Y., Roby E., Shani V., Engelender S., Wei D., Wang X.F., et al. Ubiquitination via K27 and K29 chains signals aggregation and neuronal protection of LRRK2 by WSB1. *Nat. Commun.* 2016;7:11792. doi:10.1038/ncomms11792. [DOI] [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar].
- OFFLU-WOAH/FAO. [https://rr-americas.woah.org/app/uploads/2023/03/106\\_offlu\\_gftad-americas-vaccination\\_meeting\\_esp.pdf](https://rr-americas.woah.org/app/uploads/2023/03/106_offlu_gftad-americas-vaccination_meeting_esp.pdf).
- Ohishi K, Maruyama T, Ninomiya A, Kida H, Zenitani R, Bando T, et al. (2006) Serologic investigation of influenza A virus infection in cetaceans from the western North Pacific and the Southern Oceans. *Marine Mammal Science* 22:214–221.

- Ohishi K, Ninomiya A, Kida H, Park CH, Maruyama T, Arai T, et al. Serological evidence of transmission of human influenza A and B viruses to Caspian seals (*Phoca caspica*). *Microbiol Immunol*. 2002;46:639–44. [DOI] [PubMed] [Google Scholar] [Ref list].
- Okamoto M., Kouwaki T., Fukushima Y., Oshiumi H. Regulation of RIG-I activation by K63-linked polyubiquitination. *Front. Immunol*. 2017;8:1942. doi: 10.3389/fimmu.2017.01942.[DOI] [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar].
- Okuya K, Mine J, Tokorozaki K, Kojima I, Esaki M, Miyazawa K, et al. Genetically diverse highly pathogenic avian influenza A(H5N1/H5N8) viruses among wild waterfowl and domestic poultry, Japan, 2021. *Emerg Infect Dis*. 2022;28:1451–5. <https://doi.org/10.3201/eid2807.212586>.
- Olsen B, Munster VJ, Wallensten A, Waldenstrom J, Osterhaus ADME, Fouchier RAM. Global Patterns of Influenza A virus in Wild Birds. *Science*. 2006;312:4–8. .
- Opitz, B., Rejaibi, A., Dauber, B., Eckhard, J., Vinzing, M., Schmeck, B., et al. (2007). IFN $\beta$  induction by influenza A virus is mediated by RIG-I which is regulated by the viral NS1 protein. *Cell Microbiol*. 9 (4), 930–938. doi: 10.1111/j.1462-5822.2006.00841.x.
- Organización Mundial de la Salud (OMS). Respuesta a la Amenaza de una Epidemia de Pandemia de Gripe Aviar. Medidas estratégicas recomendadas. Disponible en: [www.who.int/csr/resources/publications/influenza/WHO\\_CDS\\_CSR\\_GLIP\\_05\\_8-SP.pdf](http://www.who.int/csr/resources/publications/influenza/WHO_CDS_CSR_GLIP_05_8-SP.pdf) [citado 03 de oct. 2006].
- Ortega-Villaizán, MM.; Chico, V. y Salvador, ME (2020). IFIT5 para su uso como agente antiviral. Universidad M. Hernández/ Conocimiento y Tecnología UMH/Generalidad Valenciana. <https://ingeniumh.umh.es/patents/13>.
- Oshiumi H., Matsumoto M., Hatakeyama S., Seya T. Riplet/RNF135, a RING finger protein, ubiquitinates RIG-I to promote interferon- $\beta$  induction during the early phase of viral infection. *J. Biol. Chem*. 2009;284:807–817. doi: 10.1074/jbc.M804259200. [DOI] [PubMed] [Google Scholar].
- Oshiumi H., Miyashita M., Inoue N., Okabe M., Matsumoto M., Seya T. The ubiquitin ligase Riplet is essential for RIG-I-dependent innate immune responses to RNA virus infection. *Cell Host Microbe*. 2010;8:496–509. doi: 10.1016/j.chom.2010.11.008. [DOI] [PubMed] [Google Scholar].
- Osterhaus AD, Rimmelzwaan GF, Martina BE, Bestebroer TM, Fouchier RA. Influenza B virus in seals. *Science*. 2000;288:1051–3. 10.1126/science.288.5468.1051 [DOI] [PubMed] [Google Scholar] [Ref list].
- Ouyang, J., Zhu, X., Chen, Y., Wei, H., Chen, Q., Chi, X., et al., 2014. NRAV, a long noncoding RNA, modulates antiviral responses through suppression of interferon stimulated gene transcription. *Cell Host Microbe* 16 (5), 616–626.
- Paiva CN, Bozza MT. ¿Las especies reactivas de oxígeno son siempre perjudiciales para los patógenos? Señal redox antioxidante . 2014; 20 (6): 1000–37. doi: 10.1089/ars.2013.5447 [Artículo gratuito de PMC] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar].
- Pal S, Santos A, Rosas JM, Ortiz-Guzman J, Rosas-Acosta G. 2011. Influenza A virus interacts extensively with the cellular SUMOylation system during infection. *Virus Res* 158:12–27. <http://dx.doi.org/10.1016/j.virusres.2011.02.017>.
- Park E.S., Byun Y.H., Park S., Jang Y.H., Han W.R., Won J., Cho K.C., Kim D.H., Lee A.R., Shin G.C., et al. Co-degradation of interferon signaling factor DDX3 by PB1-F2 as a basis for high virulence of 1918 pandemic influenza. *EMBO J*. 2019;38:e99475. doi:10.15252/embj.201899475. [DOI] [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar].
- Park ES, Dezhbord M, Lee AR, Kim KH. The Roles of Ubiquitination in Pathogenesis of Influenza Virus Infection. *Int J Mol Sci*. 2022 Apr 21;23(9):4593. doi: 10.3390/ijms23094593. PMID: 35562987; PMCID: PMC9105177.
- Park, H. S., Liu, G., Thulasi Raman, S. N., Landreth, S. L., Liu, Q., Zhou, Y. (2018). NS1 protein of 2009 pandemic influenza A virus inhibits porcine NLRP3 inflammasome-mediated interleukin-1  $\beta$  production by suppressing ASC ubiquitination. *J. Virol*. 92 (8), e00022–18. doi: 10.1128/JVI.00022-18.JVI.00022-1.
- Patil G., Zhao M., Song K., Hao W., Bouchereau D., Wang L., Li S. TRIM41-mediated ubiquitination of nucleoprotein limits influenza A virus infection. *J. Virol*. 2018;92:e00905–18. doi: 10.1128/JVI.00905-18. [DOI] [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar].
- Paust, S., Gill, H. S., Wang, B. Z., Flynn, M. P., Moseman, E. A., Senman, B., et al. (2010). Critical role for the chemokine receptor CXCR6 in NK cell-mediated antigen-specific memory of haptens and viruses. *Nat. Immunol*. 11, 1127–1135. doi: 10.1038/ni.1953.
- Pavlovich SS, Lovett SP, Koroleva G, Guito JC, Arnold CE, Nagle ER, et al. The Egyptian Rousette genome reveals unexpected features of bat antiviral immunity. *Cell*. (2018) 173:1098–110. doi: 10.1016/j.cell.2018.03.070.
- Peiris M, Yuen KY, Leung CW, Chan KH, Ip PL, Lai RW, Orr WK, Shortridge KF. 1999. Human infection with influenza H9N2. *Lancet* 354:916–917. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(99\)03311-5](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(99)03311-5).

- Philippon DAM, Wu P, Cowling BJ, Lau EHY. 2020. Avian influenza human infections at the human-animal interface. *J Infect Dis* 222:528–537. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiaa105>.
- Price MJ, Hicks SL, Bradley JE, Randall TD, Boss JM, Scharer CD. IgM, IgG, and IgA Influenza-Specific Plasma Cells Express Divergent Transcriptomes. *J Immunol*. 2019 Oct 15;203(8):2121–2129. doi: 10.4049/jimmunol.1900285. Epub 2019 Sep 9. PMID: 31501259; PMCID: PMC6783370.
- Pulit-Penalzoa, JA, N. Brock, J. A. Belser, X. Sun, C. Pappas, T. J. Kieran, P. B. Thakur, H. Zeng, D. Cui, J. Frederick, R. Fasce, T. M. Tumpey, T. R. Maines, Highly pathogenic avian influenza A(H5N1) virus of clade 2.3.4.4b isolated from a human case in Chile causes fatal disease and transmits between co-housed ferrets. *Emerg. Microbes Infect.*, 2332667 (2024).
- Puryear W, Sawatzki K, Hill N, Foss A, Stone JJ, Doughty L, Walk D, Gilbert K, Murray M, Cox E, Patel P, Mertz Z, Ellis S, Taylor J, Fauquier D, Smith A, DiGiovanni RA Jr, van de Guchte A, Gonzalez-Reiche AS, Khalil Z, van Bakel H, Torchetti MK, Lantz K, Lenocho JB, Runstadler J. Highly Pathogenic Avian Influenza A(H5N1) Virus Outbreak in New England Seals, United States. *Emerg Infect Dis*. 2023 Apr;29(4):786–791. doi: 10.3201/eid2904.221538. PMID: 36958010; PMCID: PMC10045683.
- Puzelli S, Rossini G, Facchini M, Vaccari G, Di Trani L, Di Martino A, Gaibani P, Vocale C, Cattoli G, Bennett M, McCauley JW, Rezza G, Moro ML, Rangoni R, Finarelli AC, Landini MP, Castrucci MR, Donatelli I; Influenza Task Force. Human infection with highly pathogenic A(H7N7) avian influenza virus, Italy, 2013. *Emerg Infect Dis*. 2014 Oct;20(10):1745–9. doi: 10.3201/eid2010.140512. PMID: 25271444; PMCID: PMC4193179.
- Quintana López, JA 2015). XXI Jornada Médico Avícola 2015 “José Antonio Quintana López” Departamento de Medicina y Zootecnia de Aves, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM, México 04510. <https://www.avicultura.mx/destacado/Patogenia-de-la-influenza-aviar>.
- Rabalski, L.; A. Milewska, A. Pohlmann, K. Gackowska, T. Lepionka, K. Szczepaniak, A. Swiatalska, I. Sieminska, Z. Arent, M. Beer, M. Koopmans, M. Grzybek, K. Pyrc, Emergence and potential transmission route of avian influenza A (H5N1) virus in domestic cats in Poland, June 2023. *Euro Surveill*. 28 (2023).
- Rajsbaum R., Albrecht R.A., Wang M.K., Maharaj N.P., Versteeg G.A., Nistal-Villan E., Garcia-Sastre A., Gack M.U. Species-specific inhibition of RIG-I ubiquitination and IFN induction by the influenza A virus NS1 protein. *PLoS Pathog*. 2012;8:e1003059. doi: 10.1371/journal.ppat.1003059. [DOI] [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar][Ref list].
- Ramirez-Carrozzi V.R., Braas D., Bhatt D.M., Cheng C.S., Hong C., Doty K.R., Black J.C., Hoffmann A., Carey M., Smale S.T. A unifying model for the selective regulation of inducible transcription by CpG islands and nucleosome remodeling. *Cell*. 2009;138:114–128. doi: 10.1016/j.cell.2009.04.020. [DOI] [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar].
- Ramis AJ, van Riel D, van de Bildt MW, Osterhaus A, Kuiken T. Influenza A and B virus attachment to respiratory tract in marine mammals. *Emerg Infect Dis*. 2012 May;18(5):817–20. doi: 10.3201/eid1805.111828. PMID: 22516350; PMCID: PMC3358047.
- Reina J. La nueva generación de vacunas de ARN mensajero (ARNm) frente a la gripe [The new generation of messenger RNA (mRNA) vaccines against influenza]. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2023 May;41(5):301–304. Spanish. doi: 10.1016/j.eimc.2021.07.009. Epub 2021 Aug 27. PMID: 34483424; PMCID: PMC8397276.
- Reina J. Los linajes Victoria y Yamagata de los virus gripales B, desconocidos y poco valorados [The Victoria and Yamagata Lineages of Influenza B Viruses, unknown and undervalued]. *Rev Esp Quimioter*. 2022 Jun;35(3):231–235. Spanish. doi: 10.37201/req/159.2021. Epub 2022 Feb 18. PMID: 35180825; PMCID: PMC9134891.
- Reperant, L. A., Rimmelzwaan, G. F. & Kuiken, T. Avian influenza viruses in mammals. *Rev. Sci. et. Tech*. 28, 137–159 (2009).
- Richards K.A., Treanor J.J., Nayak J.L., Sant A.J. Overarching Immunodominance Patterns and Substantial Diversity in Specificity and Functionality in the Circulating Human Influenza A and B Virus-Specific CD4+ T-Cell Repertoire. *J. Infect. Dis*. 2018;218:1169–1174. doi: 10.1093/infdis/jiy288. [DOI] [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar].
- Richt JA, Lekcharoensuk P, Lager KM, Vincent AL, Loiacono CM, Janke BH, Wu WH, Yoon KJ, Webby RJ, Solórzano A, García-Sastre A. Vaccination of pigs against swine influenza viruses by using an NS1-truncated modified live-virus vaccine. *J Virol*. 2006 Nov;80(22):11009–18. doi: 10.1128/JVI.00787-06. Epub 2006 Aug 30. PMID: 16943300; PMCID: PMC1642165.
- Robb NC, Smith M, Vreede FT, Fodor E. 2009. NS2/NEP protein regulates transcription and replication of the influenza virus RNA genome. *J Gen Virol* 90:1398 –1407. <http://dx.doi.org/10.1099/vir.0.009639-0>.
- Román, E., Miller, E., Harmsen, A., Wiley, J., von Andrian, U. H., Huston, G., et al. (2002). CD4 effector T cell subsets in the response to influenza: heterogeneity, migration, and function. *J. Exp. Med*. 196, 957–968. doi: 10.1084/jem.20021052.
- Rong, E.; Hu, J.; Yang, C.; Chen, H.; Wang, Z.; Liu, X.; Liu, W.; Lu, C.; He, P.; Wang, X.; et al. Broad-spectrum antiviral functions of duck interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats (AvIFIT). *Dev. Comp. Immunol*. 2018, 84, 71–81. [Google Scholar] [CrossRef].

- Rossi D.J., Bryder D., Zahn J.M., Ahlenius H., Sonu R., Wagers A.J., Weissman I.L. Cell intrinsic alterations underlie hematopoietic stem cell aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2005;102:9194–9199. doi: 10.1073/pnas.0503280102. [DOI] [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar].
- Rovida F, Piralla A, Marzani FC, Moreno A, Campanini G, Mojoli F, Pozzi M, Girello A, Chiapponi C, Vezzoli F, Prati P, Percivalle E, Pavan A, Gramegna M, Iotti GA, Baldanti F. La infección por el virus de la gripe porcina A (H1N1) (SIV) requiere soporte vital extracorpóreo en un paciente adulto inmunocompetente con exposición indirecta a cerdos, Italia, octubre de 2016. *Euro Surveill*. 2017 Feb;22(5):30456. doi: 10.2807/1560-7917. ES.2017.22.5.30456. PMID: 28183395; PMCID: PMC5388119.
- Roy A.M., Parker J.S., Parrish C.R., Whittaker G.R. Early stages of influenza virus entry into Mv-1 lung cells: Involvement of dynamin. *Virology*. 2000; 267:17–28. doi: 10.1006/viro.1999.0109. [DOI] [PubMed] [Google Scholar].
- Roy MG, Livraghibutrico A, Fletcher AA, Mcelwee MM, Evans SE, Boerner RM, et al. Muc5b is required for airway defence. *Nature* (2014) 505(7483):412–6. 10.1038/nature12807 [DOI] [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar].
- Runstadler JA, Puryear W. Una breve introducción al virus de la gripe A en mamíferos marinos. *Métodos Mol Biol*. 2020;2123:429-450. doi: 10.1007/978-1-0716-0346-8\_33. PMID: 32170708.
- Sanchez-Aparicio M.T., Ayllon J., Leo-Macias A., Wolff T., Garcia-Sastre A. Subcellular localizations of RIG-I, TRIM25, and MAVS complexes. *J. Virol*. 2017;91:e01155-16. doi: 10.1128/JVI.01155-16. [DOI] [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar].
- Sanyal, S.; Ashour, J.; Maruyama, T.; Altenburg, A.F.; Cragolini, J.J.; Bilate, A.; Avalos, A.M.; Kundrat, L.; Garcia-Sastre, A.; Ploegh, H.L. Type I interferon imposes a TSG101/ISG15 checkpoint at the Golgi for glycoprotein trafficking during influenza virus infection. *Cell Host Microbe* 2013, 14, 510–521. [Google Scholar] [CrossRef].
- Sarukhan A (2024). <https://www.isglobal.org/healthisglobal/-/custom-blog-portlet/de-ratones-y-vacas-un-nuevo-toque-de-alerta-para-la-gripe-aviar>.
- Sasaki S., Sullivan M., Narvaez C.F., Holmes T.H., Furman D., Zheng N.Y., Nishtala M., Wrammert J., Smith K., James J.A., et al. Limited efficacy of inactivated influenza vaccine in elderly individuals is associated with decreased production of vaccine-specific antibodies. *J. Clin. Investig*. 2011;121:3109–3119. doi: 10.1172/JCI57834. [DOI] [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar].
- Sayedahmed, E.E.; Elshafie, N.O.; dos Santos, A.P.; Jagannath, C.; Sambhara, S.; Mittal, S.K. Development of NP-Based Universal Vaccine for Influenza A Viruses. *Vaccines* 2024, 12, 157. <https://doi.org/10.3390/vaccines12020157>.
- Schmidt AG, Therkelsen MD, Stewart S, Kepler TB, Liao HX, Moody MA, Haynes BF, Harrison SC. Viral receptor-binding site antibodies with diverse germline origins. *Cell*. 2015 May 21;161(5):1026-1034. doi: 10.1016/j.cell.2015.04.028. Epub 2015 May 7. PMID: 25959776; PMCID: PMC4441819.
- Schountz T, Baker ML, Butler J, Munster V. Immunological Control of Viral Infections in Bats and the Emergence of Viruses Highly Pathogenic to Humans. *Front Immunol*. 2017 Sep 11;8:1098. doi: 10.3389/fimmu.2017.01098. PMID: 28959255; PMCID: PMC5604070.
- Scull MA, Gillim-Ross L, Santos C, Roberts KL, Bordonali E, et al. (2009) Avian Influenza Virus Glycoproteins Restrict Virus Replication and Spread through Human Airway Epithelium at Temperatures of the Proximal Airways. *PLoS Pathog* 5(5): e1000424. doi:10.1371/journal.ppat.1000424.
- Sei J.J., Cox K.S., Dubey S.A., Antonello J.M., Krah D.L., Casimiro D.R., Vora K.A. Effector and Central Memory Poly-Functional CD4+ and CD8+ T Cells are Boosted upon ZOSTAVAX® Vaccination. *Front. Immunol*. 2015;6:553. doi: 10.3389/fimmu.2015.00553. [DOI] [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar].
- Shan Z, Han Q, Nie J, Cao X, Chen Z, Yin S, et al. Negative regulation of interferon-induced transmembrane protein 3 by SET7-mediated lysine monomethylation. *Journal of Biological Chemistry*. 2013;288(49):35093. pmid:24129573.
- Shan, J.; Zhao, B.; Shan, Z.; Nie, J.; Deng, R.; Xiong, R.; Tsun, A.; Pan, W.; Zhao, H.; Chen, L.; et al. Histone demethylase LSD1 restricts influenza A virus infection by erasing IFITM3-K88 monomethylation. *PLoS Pathog*. 2017, 13, e1006773. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed].
- Shulman Z., Gitlin A.D., Weinstein J.S., Lainez B., Esplugues E., Flavell R.A., Craft J.E., Nussenzweig M.C. Dynamic signaling by T follicular helper cells during germinal center B cell selection. *Science*. 2014;345:1058–1062. doi: 10.1126/science.1257861. [DOI] [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar].
- Sia WR, Zheng Y, Han F, Chen S, Ma S, Wang LF, Leeansyah E. Exploring the Role of Innate Lymphocytes in the Immune System of Bats and Virus-Host Interactions. *Viruses*. 2022 Jan 14;14(1):150. doi: 10.3390/v14010150. PMID: 35062356; PMCID: PMC8781337.
- Skowronski, D.M.; Chambers, C.; Sabaiduc, S.; De Serres, G.; Winter, A.L.; Dickinson, J.A.; Gubbay, J.B.; Drews, S.J.; Martineau, C.; Charest, H.; et al. Beyond Antigenic Match: Possible Agent-Host and Immuno-epidemiological Influences on In-

- influenza Vaccine Effectiveness During the 2015–2016 Season in Canada. *J. Infect. Dis.* 2017, 216, 1487–1500. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed] [Green Version].
- Smale ST. Transcriptional regulation in the innate immune system. *Curr Opin Immunol.* 2012 Feb;24(1):51–7. doi: 10.1016/j.coi.2011.12.008. Epub 2012 Jan 7. PMID: 22230561; PMCID: PMC3288296.
- Smith GJ, Vijaykrishna D, Bahl J, Lycett SJ, Worobey M, Pybus OG, Ma SK, Cheung CL, Raghwani J, Bhatt S, Peiris JS, Guan Y, Rambaut A. 2009. Origins and evolutionary genomics of the 2009 swine-origin H1N1 influenza A epidemic. *Nature* 459:1122–1125. <https://doi.org/10.1038/nature08182>.
- Soucy-Faulkner A, Mukawera E, Fink K, Martel A, Jouan L, Nzengue Y, et al. (2010) Requirement of NOX2 and Reactive Oxygen Species for Efficient RIG-I-Mediated Antiviral Response through Regulation of MAVS Expression. *PLoS Pathog* 6(6): e1000930. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000930>.
- Sridhar, S., Begom, S., Bermingham, A., Hoschler, K., Adamson, W., Carman, W., et al. (2013). Cellular immune correlates of protection against symptomatic pandemic influenza. *Nat. Med.* 19, 1305–1312. doi: 10.1038/nm.3350.
- Staller, E., Carrique, L., Swann, O.C. et al. Structures of H5N1 influenza polymerase with ANP32B reveal mechanisms of genome replication and host adaptation. *Nat Commun* 15, 4123 (2024). <https://doi.org/10.1038/s41467-024-48470-3>.
- Stegemann-Koniszewski, S., Behrens, S., Boehme, J. D., Hochnadel, I., Riese, P., Guzmán, C. A., et al. (2018). Respiratory influenza A virus infection triggers local and systemic natural killer cell activation via toll-like receptor 7. *Front. Immunol.* 9:245. doi: 10.3389/fimmu.2018.00245.
- Stewart I., Radtke D., Phillips B., McGowan S.J., Bannard O. Germinal Center B Cells Replace Their Antigen Receptors in Dark Zones and Fail Light Zone Entry when Immunoglobulin Gene Mutations are Damaging. *Immunity.* 2018;49:477–489 e477. doi: 10.1016/j.immuni.2018.08.025. [DOI] [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar].
- Su S, Bi Y, Wong G, Gray GC, Gao GF, Li S. Epidemiología, evolución y brotes recientes del virus de la gripe aviar en China. *J Virol.* 2015;89:8671–6. doi: 10.1128/JVI.01034-15. PMID:26063419 [DOI] [Artículo gratuito de PMC] [PubMed] [Google Scholar][Lista de referencia].
- Su W.C., Chen Y.C., Tseng C.H., Hsu P.W., Tung K.F., Jeng K.S., Lai M.M. Pooled RNAi screen identifies ubiquitin ligase Itch as crucial for influenza A virus release from the endosome during virus entry. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2013; 110:17516–17521. doi: 10.1073/pnas.1312374110. [DOI] [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar].
- Su W.C., Yu W.Y., Huang S.H., Lai M.M.C. Ubiquitination of the cytoplasmic domain of influenza A virus M2 protein is crucial for production of infectious virus particles. *J. Virol.* 2018;92:e01972–17. doi: 10.1128/JVI.01972-17. [DOI] [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar].
- Su, Shuo; Xinliang Fu; Gairu Li; Fiona Kerlin; Michael Veit (25 August 2017). "Novel Influenza D virus: Epidemiology, pathology, evolution and biological characteristics". *Virulence.* 8 (8): 1580–1591. doi:10.1080/21505594.2017.1365216. PMC 5810478. PMID 28812422.
- Su, W.; R. Harfoot, Y. C. F. Su, J. DeBeauchamp, U. Joseph, J. Jayakumar, J.-C. Crumpton, T. Jeevan, A. Rubrum, J. Franks, P. N. Q. Pascua, C. Kackos, Y. Zhang, M. Zhang, Y. Ji, H. T. Bui, J. C. Jones, L. Kercher, S. Krauss, S. Pleschka, M. C. W. Chan, R. G. Webster, C.-Y. Wu, K. Van Reeth, M. Peiris, R. J. Webby, G. J. D. Smith, H.-L. Yen, Ancestral sequence reconstruction pinpoints adaptations that enable avian influenza virus transmission in pigs. *Nat Microbiol* 6, 1455–1465 (2021).
- Subbarao EK, London W, Murphy BR. 1993. A single amino acid in the PB2 gene of influenza A virus is a determinant of host range. *J Virol* 67:1761–1764.
- Sun et al., 2023, *Cell* 186, 4074–4084 September 14, 2023 © 2023 Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2023.08.011>.
- Sun H, Li F, Liu Q, Du J, Liu L, Sun H, et al. Mink is a highly susceptible host species to circulating human and avian influenza viruses. *Emerg Microbes Infect.* 2021;10(1):472–80. 10.1080/22221751.2021.1899058 [DOI] [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar].
- Sun W, Zhang Z, Chen M, Liu X, Wang Y, Yao S, Li L. Discovery of a potent inhibitor targeting the cap-binding domain of the PB2 subunit of influenza RNA-dependent RNA polymerase. *Biochem Biophys Res Commun.* 2023 Oct 20;678:97–101. doi: 10.1016/j.bbrc.2023.08.027. Epub 2023 Aug 12. PMID: 37625270.
- Syed, F.M.; Khan, M.A.; Nasti, T.H.; Ahmad, N.; Mohammad, O. Antigen entrapped in escheriosomes leads to the generation of CD4+ helper and CD8+ cytotoxic T cell response. *Vaccine* 2003, 21, 2383–2393. [CrossRef].
- Tan MP, Tan WS, Mohamed Alitheen NB, Yap WB. M2e-Based Influenza Vaccines with Nucleoprotein: A Review. *Vaccines* (Basel). 2021 Jul 4;9(7):739. doi: 10.3390/vaccines9070739. PMID: 34358155; PMCID: PMC8310010.
- Tang, Y.; Zhong, G.; Zhu, L.; Liu, X.; Shan, Y.; Feng, H.; Bu, Z.; Chen, H.; Wang, C. Herc5 attenuates influenza A virus by catalyzing ISGylation of viral NS1 protein. *J. Immunol.* 2010, 184, 5777–5790. [Google Scholar] [CrossRef].

- Tao W., Gill H.S. M2e-immobilized gold nanoparticles as influenza A vaccine: Role of soluble M2e and longevity of protection. *Vaccine*. 2015;33:2307–2315. doi: 10.1016/j.vaccine.2015.03.063. [DOI] [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar].
- Tapia R, Brito B, Saavedra M, Mena J, GarcíaSalum T, Rathnasinghe R, Barriga G, Tapia K, García V, Bucarey S, Jang Y, Wentworth D, Torremorell M, Neira V, Medina RA. 2024. Novel influenza A viruses in pigs with zoonotic potential, Chile. *Microbiol Spectr* 12:e02181-23. <https://doi.org/10.1128/spectrum.02181-23>.
- Tapia R, García V, Mena J, Bucarey S, Medina RA, Neira V. Infection of novel reassortant H1N2 and H3N2 swine influenza A viruses in the guinea pig model. *Vet Res*. 2018 Jul 27;49(1):73. doi: 10.1186/s13567-018-0572-4. PMID: 30053826; PMCID: PMC6062863.
- Tas J.M., Mesin L., Pasqual G., Targ S., Jacobsen J.T., Mano Y.M., Chen C.S., Weill J.C., Reynaud C.A., Browne E.P., et al. Visualizing antibody affinity maturation in germinal centers. *Science*. 2016;351:1048–1054. doi: 10.1126/science.aad3439. [DOI] [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar].
- Tate MD, Deng YM, Jones JE, Anderson GP, Brooks AG, Reading PC. Neutrophils ameliorate lung injury and the development of severe disease during influenza infection. *J. Immunol*. 2009; 183: 7441–50. [DOI] [PubMed] [Google Scholar][Ref list].
- Tecle, T., White, M., Crouch, E. and Hartshorn, K., Human neutrophil defensins increase neutrophil uptake of influenza A virus and bacteria and modify virus-induced respiratory burst responses. *J. Immunol*. 2007. 178:.
- Terrier, O.; Textoris, J.; Carron, C.; Marcel, V.; Bourdon, J.C.; Rosa-Calatrava, M. Host microRNA molecular signatures associated with human H1N1 and H3N2 influenza A viruses reveal an unanticipated antiviral activity for miR-146a. *J. Gen. Virol*. 2013, 94, 985–995. [CrossRef] [PubMed].
- These antibodies could thus offer cross reactive protection (14, 15). ADCC could be the main mechanism in which antibodies against conserved (but subdominant) epitopes work.
- Thulasi Raman S.N., Liu G., Pyo H.M., Cui Y.C., Xu F., Ayalew L.E., Tikoo S.K., Zhou Y. DDX3 interacts with influenza A virus NS1 and NP proteins and exerts antiviral function through regulation of stress granule formation. *J. Virol*. 2016;90:3661–3675. doi: 10.1128/JVI.03010-15. [DOI] [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar].
- Thulasi Raman, S. N., Zhou, Y. (2016). Networks of host factors that interact with NS1 protein of influenza a virus. *Front. Microbiol*. 7. doi: 10.3389/fmicb.2016.00654.
- To EE, Erlich JR, Liong F, Luong R, Liong S, Esaq F, Oseghale O, Anthony D, McQualter J, Bozinovski S, Vlahos R, O'Leary JJ, Brooks DA, Selemidis S. Mitochondrial Reactive Oxygen Species Contribute to Pathological Inflammation During Influenza A Virus Infection in Mice. *Antioxid Redox Signal*. 2020 May 1;32(13):929-942. doi: 10.1089/ars.2019.7727. Epub 2019 Jul 12. PMID: 31190565; PMCID: PMC7104903.
- To EE, Vlahos R, Luong R, Halls ML, Reading PC, King PT, Chan C, Drummond GR, Sobey CG, Broughton BRS *et al*. Endosomal NOX2 oxidase exacerbates virus pathogenicity and is a target for antiviral therapy. *Nat. Commun*. 2017; 8: 69. [DOI] [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar][Ref list].
- Tomás, G.; A. Marandino, Y. Panzera, S. Rodríguez, G. L. Wallau, F. Z. Dezordi, R. Pérez, L. Bassetti, R. Negro, J. Williman, V. Uriarte, F. Grazioli, C. Leizagoyen, S. Riverón, J. Coronel, S. Bello, E. Páez, M. Lima, V. Méndez, R. Pérez, Highly pathogenic avian influenza H5N1 virus infections in pinnipeds and seabirds in Uruguay: implications for bird-mammal transmission in South America. *Virus Evol*, doi: 10.1093/ve/veae031.
- Tong S, Li Y, Rivallier P, Conrardy C, Castillo DA, Chen LM, Recuenco S, Ellison JA, Davis CT, York IA, Turmelle AS, Moran D, Rogers S, Shi M, Tao Y, Weil MR, Tang K, Rowe LA, Sammons S, Xu X, Frace M, Lindblade KA, Cox NJ, Anderson LJ, Rupprecht CE, Donis RO. A distinct lineage of influenza A virus from bats. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012 Mar 13;109(11):4269-74. doi: 10.1073/pnas.1116200109. Epub 2012 Feb 27. PMID: 22371588; PMCID: PMC3306675.
- Tong S, Li Y, Rivallier P, Conrardy C, Castillo DAA, Chen L, Recuenco S, Ellison JA, Davis CT, York IA, Turmelle AS, Moran D, Rogers S, Shi M, Tao Y, Weil MR, Tang K, Rowe LA, Sammons S, Xu X, Frace M, Lindblade KA, Cox NJ, Anderson LJ, Rupprecht CE, Donis RO. 2012. A distinct lineage of influenza A virus from bats. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109:4269–4274.
- Tong S, Zhu X, Li Y, Shi M, Zhang J, Bourgeois M, Yang H, Chen X, Recuenco S, Gomez J, Chen L, Johnson A, Tao Y, Dreyfus C, Yu W, McBride R, Carney PJ, Gilbert AT, Chang J, Guo Z, Davis CT, Paulson JC, Stevens J, Rupprecht CE, Holmes EC, Wilson IA, Donis RO. 2013. New World bats harbor diverse influenza A viruses. *PLoS Pathog* 9:e1003657.
- Tong S, Zhu X, Li Y, Shi M, Zhang J, Bourgeois M, Yang H, Chen X, Recuenco S, Gomez J, Chen LM, Johnson A, Tao Y, Dreyfus C, Yu W, McBride R, Carney PJ, Gilbert AT, Chang J, Guo Z, Davis CT, Paulson JC, Stevens J, Rupprecht CE, Holmes EC, Wilson IA, Donis RO. New world bats harbor diverse influenza A viruses. *PLoS Pathog*. 2013;9(10):e1003657. doi: 10.1371/journal.ppat.1003657. Epub 2013 Oct 10. PMID: 24130481; PMCID: PMC3794996.

- Tong S, Zhu X, Li Y, Shi M, Zhang J, Bourgeois M, Yang H, Chen X, Recuenco S, Gomez J, Chen LM, Johnson A, Tao Y, Dreyfus C, Yu W, McBride R, Carney PJ, Gilbert AT, Chang J, Guo Z, Davis CT, Paulson JC, Stevens J, Rupprecht CE, Holmes EC, Wilson IA, Donis RO. New world bats harbor diverse influenza A viruses. *PLoS Pathog.* 2013;9(10):e1003657. doi: 10.1371/journal.ppat.1003657. Epub 2013 Oct 10. PMID: 24130481; PMCID: PMC3794996.
- Townsend, A. R., McMichael, A. J., Carter, N. P., Huddleston, J. A., and Brownlee, G. G. (1984). Cytotoxic T cell recognition of the influenza nucleoprotein and hemagglutinin expressed in transfected mouse L cells. *Cell* 39, 13–25. doi: 10.1016/0092-8674(84)90187-9.
- Treanor JJ. Influenza viruses, including avian influenza and swine influenza. In: Bennett JE, Dolin R, Blaser MJ, eds. *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases*. 9th ed. Philadelphia, PA: Elsevier; 2020:chap 165.
- Tumpey TM, García-Sastre A, Taubenberger JK, Palese P, Swayne DE, Pantin-Jackwood MJ, Schultz-Cherry S, Solórzano A, Van Rooijen N, Katz JM *et al.* Pathogenicity of influenza viruses with genes from the 1918 pandemic virus: functional roles of alveolar macrophages and neutrophils in limiting virus replication and mortality in mice. *J. Virol.* 2005; 79: 14933–44. [DOI] [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar][Ref list].
- Turner J.S., Zhou J.Q., Han J., Schmitz A.J., Rizk A.A., Alsoussi W.B., Lei T., Amor M., McIntire K.M., Meade P., *et al.* Human germinal centres engage memory and naive B cells after influenza vaccination. *Nature.* 2020;586:127–132. doi: 10.1038/s41586-020-2711-0. [DOI] [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar].
- Turner J.S., Zhou J.Q., Han J., Schmitz A.J., Rizk A.A., Alsoussi W.B., Lei T., Amor M., McIntire K.M., Meade P., *et al.* Human germinal centres engage memory and naive B cells after influenza vaccination. *Nature.* 2020;586:127–132. doi: 10.1038/s41586-020-2711-0. [DOI] [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar].
- Turrell L, Hutchinson EC, Vreede FT, Fodor E. 2015. Regulation of influenza A virus nucleoprotein oligomerization by phosphorylation. *J Virol* 89:1452–1455. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.02332-14>.
- Uhart MM, Vanstreels RET, Nelson MI, Olivera V, Campagna J, Zavattieri V, Lemey P, Campagna C, Falabella V, Rimondi A. Epidemiological data of an influenza A/H5N1 outbreak in elephant seals in Argentina indicates mammal-to-mammal transmission. *Nat Commun.* 2024 Nov 11;15(1):9516. doi: 10.1038/s41467-024-53766-5. PMID: 39528494; PMCID: PMC11555070.
- Umar, S., Kim, S., Gao, D. and Chen, P. (2024), Evidence of Reverse Zoonotic Transmission of Human Seasonal Influenza A Virus (H1N1, H3N2) Among Cats. *Influenza Other Respi Viruses*, 18: e13296. <https://doi.org/10.1111/irv.13296>.
- Unali, G., *et al.* Interferon-inducible phospholipids govern IFITM3-dependent endosomal antiviral immunity. *Embo j*, e112234 (2023).
- Uyeki, T.; S. Milton, C. A. Hamid, C. R. Webb, S. M. Presley, V. Shetty, S. N. Rollo, D. L. Martinez, S. Rai, E. R. Gonzales, K. L. Kniss, Y. Jang, J. C. Frederick, J. A. De La Cruz, J. Liddell, H. Di, M. K. Kirby, J. R. Barnes, C. Todd Davis, Highly Pathogenic Avian Influenza A(H5N1) Virus Infection in a Dairy Farm Worker. *N. Engl. J. Med.* (2024).
- Valerdi K.M., Hage A., van Tol S., Rajsbaum R., Giraldo M.I. The role of the host ubiquitin system in promoting replication of emergent viruses. *Viruses.* 2021;13:369. doi: 10.3390/v13030369. [DOI] [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar].
- Valkenburg, S. A., Fang, V. J., Leung, N. H., Chu, D. K., Ip, D. K., Perera, R. A., *et al.* (2019). Cross-reactive antibody-dependent cellular cytotoxicity antibodies are increased by recent infection in a household study of influenza transmission. *Clin. Transl. Immunol.* 8, e1092. doi: 10.1002/cti2.1092.
- Van Assche T, Deschacht M, da Luz RA, Maes L, and Cos P. Leishmania-macrophage interactions: insights into the redox biology. *Free Radic Biol Med* 51: 337–351, 2011.
- van der Lubbe J.E.M., Huizingh J., Verspuij J.W.A., Tetterso L., Schmit-Tillemans S.P.R., Mooij P., Mortier D., Koopman G., Bogers W., Dekking L., *et al.* Mini-hemagglutinin vaccination induces cross-reactive antibodies in pre-exposed NHP that protect mice against lethal influenza challenge. *NPJ Vaccines.* 2018;3:25. doi: 10.1038/s41541-018-0063-7. [DOI] [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar].
- van Diemen PM, Byrne AMP, Ramsay AM, Watson S, Nunez A, V Moreno A, Chiapponi C, Foni E, Brown IH, Brookes SM, Everett HE. Interspecies Transmission of Swine Influenza A Viruses and Human Seasonal Vaccine-Mediated Protection Investigated in Ferret Model. *Emerg Infect Dis.* 2023 Sep;29(9):1798-1807. doi: 10.3201/eid2909.230066. PMID: 37610158; PMCID: PMC10461666.
- Van Dommelen, S. L. and Degli-Esposti, M. A., NKT cells and viral Immunity. *Immunol. Cell Biol.* 2004. 82: 332–341.
- Van Reeth K, Ma W. Swine influenza virus vaccines: to change or not to change-that's the question. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2013;370:173-200. doi: 10.1007/82\_2012\_266. PMID: 22976350.
- Vandervan, H. A., Ana-Sosa-Batiz, F., Jegaskanda, S., Rockman, S., Laurie, K., Barr, I., *et al.* (2016). What lies beneath: antibody dependent natural killer cell activation by antibodies to internal influenza virus proteins. *EBioMedicine* 8, 277–290. doi: 10.1016/j.ebiom.2016.04.029.

- Vandoorn, E; Parys, A; Chepkwony, S; Chiers, K and Van Reeth, K. (2002). Efficacy of the NS1-truncated live attenuated influenza virus vaccine for swine against infection with viruses of major North American and European H3N2 lineages, *Vaccine*, Volume 40, Issue 19, Pages 2723-2732, ISSN 0264-410X, <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2022.03.051>. (<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0264410X22003620>).
- Varga Z.T., Grant A., Manicassamy B., Palese P. Influenza virus protein PB1-F2 inhibits the induction of type I interferon by binding to MAVS and decreasing mitochondrial membrane potential. *J. Virol.* 2012;86:8359–8366. doi: 10.1128/JVI.01122-12. [DOI] [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar][Ref list]].
- Varga Z.T., Ramos I., Hai R., Schmolke M., García-Sastre A., Fernandez-Sesma A., Palese P. The influenza virus protein PB1-F2 inhibits the induction of type I interferon at the level of the MAVS adaptor protein. *PLoS Pathog.* 2011;7:e1002067. doi: 10.1371/journal.ppat.1002067.[DOI] [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar].
- Vasin, AV; O.A. Temkina, V.V. Egorov, S.A. Klotchenko, M.A. Plotnikova, O.I. Kiselev, Molecular mechanisms enhancing the proteome of influenza A viruses: An overview of recently discovered proteins, *Virus Research*, Volume 185, 2014, Pages 53-63, ISSN 0168-1702, <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2014.03.015>. (<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168170214001221>).
- Viant C., Weymar G.H.J., Escolano A., Chen S., Hartweg H., Cipolla M., Gazumyan A., Nussenzweig M.C. Antibody Affinity Shapes the Choice between Memory and Germinal Center B Cell Fates. *Cell.* 2020;183:1298–1311 e1211. doi: 10.1016/j.cell.2020.09.063. [DOI] [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar].
- Vidic J., Richard C.A., Péchoux C., Da Costa B., Bertho N., Mazerat S., Delmas B., Chevalier C. Amyloid assemblies of influenza A virus PB1-F2 protein damage membrane and induce cytotoxicity. *J. Biol. Chem.* 2016;291:739–751. doi: 10.1074/jbc.M115.652917. [DOI] [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar].
- Villalon-Letelier F, Brooks AG, Londrigan SL, Reading PC. MARCH8 Restricts Influenza A Virus Infectivity but Does Not Downregulate Viral Glycoprotein Expression at the Surface of Infected Cells. *MBio.*2021; 12(5):e0148421. <https://doi.org/10.1128/mBio.01484-21> PMID: 34517760.
- Villalon-Letelier F, Farrukhee R, Londrigan SL, Brooks AG, Reading PC. Isoforms of Human MARCH1 Differ in Ability to Restrict Influenza A Viruses Due to Differences in Their N Terminal Cytoplasmic Domain. *Viruses.* 2022; 14(11). <https://doi.org/10.3390/v14112549> PMID: 36423158.
- Vincent A, Awada L, Brown I, Chen H, Claes F, Dauphin G, Donis R, Culhane M, Hamilton K, Lewis N, Mumford E, Nguyen T, Parchariyanon S, Pasick J, Pavade G, Pereda A, Peiris M, Saito T, Swenson S, Van Reeth K, Webby R, Wong F, Ciacchi-Zanella J. Review of influenza A virus in swine worldwide: a call for increased surveillance and research. *Zoonoses Public Health.* 2014 Feb;61(1):4-17. doi: 10.1111/zph.12049. Epub 2013 Apr 5. PMID: 23556412.
- Vlahos R, Stambas J, Bozinovski S, Broughton BR, Drummond GR, and Selemidis S. Inhibition of nox2 oxidase activity ameliorates influenza a virus-induced lung inflammation. *PLoS Pathog* 7: e1001271, 2011.
- Vohr H.-W., editor. *Encyclopedic Reference of Immunotoxicology*. Springer; Berlin/Heidelberg, Germany: 2005. T Cell-Dependent Antigen; p. 626. [DOI] [Google Scholar].
- Wang J, Cen S. Roles of lncRNAs in influenza virus infection. *Emerg Microbes Infect.* 2020 Dec;9(1):1407-1414. doi: 10.1080/22221751.2020.1778429. PMID: 32543285; PMCID: PMC7473136.
- Wang K., Zou C., Wang X., Huang C., Feng T., Pan W., Wu Q., Wang P., Dai J. Interferon-stimulated TRIM69 interrupts dengue virus replication by ubiquitinating viral nonstructural protein 3. *PLoS Pathog.* 2018;14:e1007287. doi: 10.1371/journal.ppat.1007287. [DOI] [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar].
- Wang Q, Liu R, Li Q, Wang F, Zhu B, Zheng M, Cui H, Wen J, Zhao G. Interatoma de células huésped de la proteína PB1 N40 del virus de la gripe A H5N1 en células de pollo. *J Proteómica.* 15 de abril de 2019;197:34-41. doi: 10.1016/j.jprot.2019.02.011. Epub 2019 18 de febrero. PMID: 30790688.
- Wang S., Le T.Q., Kurihara N., Chida J., Cisse Y., Yano M., Kido H. Influenza virus-cytokine-protease cycle in the pathogenesis of vascular hyperpermeability in severe influenza. *J. Infect. Dis.* 2010;202:991–1001. doi: 10.1086/656044. [DOI] [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar].
- Wang, X., Li, M., Zheng, H., Muster, T., Palese, P., Beg, A. A., et al. (2000). Influenza a virus NS1 protein prevents activation of NF-kappaB and induction of alpha/beta interferon. *J. Virol.* 74 (24), 11566–11573. doi: 10.1128/jvi.74.24.11566-11573.2000.
- Wang, Z., Tian, C., Zhu, J. *et al.* Avian influenza mRNA vaccine encoding hemagglutinin provides complete protection against divergent H5N1 viruses in specific-pathogen-free chickens. *J Nanobiotechnol* 23, 55 (2025). <https://doi.org/10.1186/s12951-025-03156-w>.

- Wardemann H., Yurasov S., Schaefer A., Young J.W., Meffre E., Nussenzweig M.C. Predominant autoantibody production by early human B cell precursors. *Science*. 2003;301:1374–1377. doi: 10.1126/science.1086907. [DOI] [PubMed] [Google Scholar].
- Warr GW, Magor KE, Higgins DA (1995) IgY: clues to the origins of modern antibodies. *Immunol Today* 16: 392–398.
- Watanabe T, Watanabe S, Maher EA, Neumann G, Kawaoka Y. Potencial pandémico de los virus de la gripe aviar A (H7N9). *Tendencias en Microbiología*. 2014;22:623–31. doi: 10.1016/j.tim.2014.08.008. PMID: 25264312 [DOI] [Artículo gratuito de PMC] [PubMed] [Google Scholar].
- Watanabe, R.; Leser, G.P.; Lamb, R.A. Influenza virus is not restricted by tetherin whereas influenza VLP production is restricted by tetherin. *Virology* 2011, 417, 50–56. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed].
- Weidenbacher P.A., Kim P.S. Protect, modify, deprotect (PMD): A strategy for creating vaccines to elicit antibodies targeting a specific epitope. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2019;116:9947–9952. doi: 10.1073/pnas.1822062116. [DOI] [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar].
- White, M. R., Tecle, T., Crouch, E. C. and Hartshorn, K. L., Impact of neutrophils on antiviral activity of human bronchoalveolar lavage fluid. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 2007. 293: L1293–L1299.
- Wong, T.M.; Allen, J.D.; Bebin-Blackwell, A.G.; Carter, D.M.; Alefantis, T.; DiNapoli, J.; Kleanthous, H.; Ross, T.M. Computationally Optimized Broadly Reactive Hemagglutinin Elicits Hemagglutination Inhibition Antibodies against a Panel of H3N2 Influenza Virus Cocirculating Variants. *J. Virol.* 2017, 91, e01581–17. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed] [Green Version].
- World Health Organization, World Organization for Animal Health, Food and Agriculture Organization H5N1 Evolution Working Group. Revised and updated nomenclature for highly pathogenic avian influenza A(H5N1) viruses. *Influenza Other Respir Viruses*. 2014;8:384–8. https://doi.org/10.1111/irv.12230.
- Wrammert J., Koutsouanos D., Li G.M., Edupuganti S., Sui J., Morrissey M., McCausland M., Skountzou I., Hornig M., Lipkin W.I., et al. Broadly cross-reactive antibodies dominate the human B cell response against 2009 pandemic H1N1 influenza virus infection. *J. Exp. Med.* 2011;208:181–193. doi: 10.1084/jem.20101352. [DOI] [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar].
- Wrammert J., Smith K., Miller J., Langley W.A., Kokko K., Larsen C., Zheng N.Y., Mays I., Garman L., Helms C., et al. Rapid cloning of high-affinity human monoclonal antibodies against influenza virus. *Nature*. 2008;453:667–671. doi: 10.1038/nature06890. [DOI] [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar].
- Wu X., Wang J., Wang S., Wu F., Chen Z., Li C., Cheng G., Qin F.X. Inhibition of influenza A virus replication by TRIM14 via its multifaceted protein-protein interaction with NP. *Front.Microbiol.* 2019;10:344. doi: 10.3389/fmicb.2019.00344. [DOI] [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar].
- Wu Y, Wu Y, Tefsen B, Shi Y, Gao GF. Bat-derived influenza-like viruses H17N10 and H18N11. *Trends Microbiol.* 2014;22(4):183–91.
- Wu, K.W.; Chien, C.Y.; Li, S.W.; King, C.C.; Chang, C.H. Highly conserved influenza A virus epitope sequences as candidates of H3N2 flu vaccine targets. *Genomics* 2012, 100, 102–109. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed] [Green Version].
- Wurbel MA, Philippe JM, Nguyen C, Victorero G, Freeman T, Wooding P, Miazek A, Mattei MG, Malissen M, Jordan BR, Malissen B, Carrier A, and Naquet P 2000. The chemokine TECK is expressed by thymic and intestinal epithelial cells and attracts double- and single-positive thymocytes expressing the TECK receptor CCR9. *Eur J Immunol* 30: 262–271. [DOI] [PubMed] [Google Scholar][Ref list].
- Xia C., Vijayan M., Pritzl C.J., Fuchs S.Y., McDermott A.B., Hahm B. Hemagglutinin of influenza A virus antagonizes type I interferon (IFN) responses by inducing degradation of type I IFN receptor 1. *J. Virol.* 2015;90:2403–2417. doi: 10.1128/JVI.02749-15. [DOI] [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar][Ref list].
- Xiang Z., Cutler A.J., Brownlie R.J., Fairfax K., Lawlor K.E., Severinson E., Walker E.U., Manz R.A., Tarlinton D.M., Smith K.G. FcγRIIb controls bone marrow plasma cell persistence and apoptosis. *Nat. Immunol.* 2007;8:419–429. doi: 10.1038/ni1440. [DOI] [PubMed] [Google Scholar].
- Xiao Y., Evseev D., Stevens C.A., Moghrabi A., Miranzo-Navarro D., Fleming-Canepa X., Tetrault D.G., Magor K.E. Influenza PB1-F2 Inhibits Avian MAVS Signaling. *Viruses*. 2020;12:409. doi: 10.3390/v12040409. [DOI] [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar].
- Xie R, Edwards KM, Wille M, Wei X, Wong SS, Zanin M, El-Shesheny R, Ducatez M, Poon LLM, Kayali G, Webby RJ, Dhanasekaran V. The episodic resurgence of highly pathogenic avian influenza H5 virus. *Nature*. 2023 Oct;622(7984):810–817. doi: 10.1038/s41586-023-06631-2. Epub 2023 Oct 18. PMID: 37853121.
- Xie, R.; K. M. Edwards, M. Wille, X. Wei, S.-S. Wong, M. Zanin, R. El-Shesheny, M. Ducatez, L. L. M. Poon, G. Kayali, R. Webby, J.; V. Dhanasekaran, The episodic resurgence of highly pathogenic avian influenza H5 virus. *Nature* 622, 810–817 (2023). .

- Yang J, Liu S, Du L, Jiang S. A new role of neuraminidase (NA) in the influenza virus life cycle: implication for developing NA inhibitors with novel mechanism of action. *Rev Med Virol* (2016) 26(4):242–50. 10.1002/rmv.1879 [DOI] [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar].
- Yang, J.; C. Zhang, Y. Yuan, J. Sun, L. Lu, H. Sun, H. Sun, D. Chu, S. Qin, J. Chen, C. Zhang, X. Hao, W. Shi, W. Liu, G. Gao, F.; P. Digard, S. Lycett, Y. Bi, Novel Avian Influenza Virus (H5N1) Clade 2.3.4.4b Reassortants in Migratory Birds, China. *Emerg. Infect. Dis.* 29, 1244–1249 (2023).
- Yassine H.M., Boyington J.C., McTamney P.M., Wei C.J., Kanekiyo M., Kong W.P., Gallagher J.R., Wang L., Zhang Y., Joyce M.G., et al. Hemagglutinin-stem nanoparticles generate heterosubtypic influenza protection. *Nat. Med.* 2015;21:1065–1070. doi: 10.1038/nm.3927. [DOI] [PubMed] [Google Scholar].
- Yoneyama M., Fujita T. Structural mechanism of RNA recognition by the RIG-I-like receptors. *Immunity*. 2008;29:178–181. doi: 10.1016/j.immuni.2008.07.009. [DOI] [PubMed] [Google Scholar].
- Yoneyama M., Kikuchi M., Natsukawa T., Shinobu N., Imaizumi T., Miyagishi M., Taira K., Akira S., Fujita T. The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. *Nat. Immunol.* 2004;5:730–737. doi: 10.1038/ni1087.[DOI] [PubMed] [Google Scholar].
- Yoshizumi T., Ichinohe T., Sasaki O., Otera H., Kawabata S., Mihara K., Koshiba T. Influenza A virus protein PB1-F2 translocates into mitochondria via Tom40 channels and impairs innate immunity. *Nat. Commun.* 2014;5:4713. doi: 10.1038/ncomms5713. [DOI] [PubMed] [Google Scholar].
- Yu C, Liu Q, Zhao Z, Zhai J, Xue M, Tang YD, Wang C, Zheng C. The emerging roles of MARCH8 in viral infections: A double-edged sword. *PLoS Pathog.* 2023 Sep 14;19(9):e1011619. doi: 10.1371/journal.ppat.1011619. PMID: 37708148; PMCID: PMC10501654.
- Yu Z., Chen T., Li X., Yang M., Tang S., Zhu X., Gu Y., Su X., Xia M., Li W., et al. Lys29-linkage of ASK1 by Skp1-Cullin 1-Fbxo21 ubiquitin ligase complex is required for antiviral innate response. *eLife*. 2016;5:e14087. doi: 10.7554/eLife.14087. [DOI] [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar].
- Zarnitsyna V.I., Ellebedy A.H., Davis C., Jacob J., Ahmed R., Antia R. Masking of antigenic epitopes by antibodies shapes the humoral immune response to influenza. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 2015;370 doi: 10.1098/rstb.2014.0248. [DOI] [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar].
- Zhang X.Z., Li F.H., Wang X.J. Regulation of tripartite motif-containing proteins on immune response and viral evasion. *Front. Microbiol.* 2021;12:794882. doi: 10.3389/fmicb.2021.794882. [DOI] [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar][Ref list].
- Zhang Y., Meyer-Hermann M., George L.A., Figge M.T., Khan M., Goodall M., Young S.P., Reynolds A., Falciani F., Waisman A., et al. Germinal center B cells govern their own fate via antibody feedback. *J. Exp. Med.* 2013;210:457–464. doi: 10.1084/jem.20120150. [DOI] [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar].
- Zhao K, Gu M, Zhong L, Duan Z, Zhang Y, Zhu Y, Zhao G, Zhao M, Chen Z, Hu S, et al. Caracterización de tres virus de la gripe aviar altamente patógena H5N5 y uno H5N8 en China. *Microbiol veterinario*. 2013;163:351-7. doi: 10.1016/j.vetmic.2012.12.025. PMID:23375651 [DOI] [PubMed] [Google Scholar][Lista de referencia].
- Zheng W, Li J, Wang S, Cao S, Jiang J, Chen C, Ding C, Qin C, Ye X, Gao GF, Liu W. 2015. Phosphorylation controls the nuclear-cytoplasmic shuttling of influenza A virus nucleoprotein. *J Virol* 89:5822–5834. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.00015-15>.
- Zheng, Y.; Hao, X.; Zheng, Q.; Lin, X.; Zhang, X.; Zeng, W.; Ding, S.; Zhou, P.; Li, S. Canine Influenza Virus is Mildly Restricted by Canine Tetherin Protein. *Viruses* 2018, 10, 565. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed].
- Zhou, P. et al. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 113, 2696–2701 (2016).
- Zhu, Z.; Shi, Z.; Yan, W.; Wei, J.; Shao, D.; Deng, X.; Wang, S.; Li, B.; Tong, G.; Ma, Z. Nonstructural protein 1 of influenza A virus interacts with human guanylate-binding protein 1 to antagonize antiviral activity. *PLoS ONE* 2013, 8, e55920. [Google Scholar] [CrossRef].
- Zhuang Q Y, Wang S C, Wu M L, et al. Epidemiological and risk analysis of the H7N9 subtype influenza outbreak in China at its early stage. *Chin Sci Bull*, 2013, 58: 3183–3187, doi: 10.1007/s11434-013-5880-5.
- Zoetis España <https://www2.zoetis.es/productos-y-soluciones/porcino/virus-de-la-gripe-porcina>.

**AGRADECIMIENTOS:** A Pedro A. Alegre Amor, Secretario de SOCIVESC, por su imprescindible ayuda en la producción informática de este trabajo de revisión bibliográfica.