

# Factores de virulencia y patogenicidad en las cepas gripales (virus influenza tipo A) aviares y humanas

Jordi Reina

Unidad de Virología. Servicio de Microbiología Clínica. Hospital Universitario Son Dureta. Palma de Mallorca. España.

La mayoría de estudios realizados en cepas gripales aviares parecen indicar que la virulencia es un fenómeno poligénico. Sin embargo, parece demostrado que la hemaglutinina (HA) y la neuraminidasa (NA) y los genes que las codifican (genes 4 y 6) desempeñan un papel esencial en la patogenia viral. Las cepas aviares pueden clasificarse en avirulentas o virulentas en función de la capacidad de la HA para ser activada por endoproteasas sólo del tracto respiratorio o por proteasas de otros tejidos. Esta capacidad se basa en la aparición progresiva de mutaciones que comportan la sustitución de los aminoácidos habituales en el punto de hidrólisis de la HA por otros de tipo básico que determinan la ampliación del espectro de hidrólisis y activación. La NA participa en la adquisición de virulencia a través de su capacidad para unirse al plasminógeno e incrementando la concentración de proteasas activadoras. La adaptación al huésped, a través del reconocimiento del receptor celular, es otro factor que determina la virulencia y la transmisión interespecies de las cepas aviares. Desde el punto de vista epidemiológico sería recomendable, además de la subtipificación de las cepas gripales, determinar la capacidad de activación de la HA para conocer su grado de virulencia.

**Palabras clave:** Gripe. Factores de virulencia. Hemaglutinina. Neuraminidasa.

Factors affecting the virulence and pathogenicity of avian and human viral strains (influenza virus type A)

Most studies performed in avian viral strains seem to indicate that virulence is a polygenic phenomenon. However, hemagglutinin and neuraminidase and the genes codifying these substances (genes 4 and 6) play an essential role in viral pathogenesis. Avian strains can be classified as avirulent or virulent according to the ability of hemagglutinin to be activated by endoproteases of the

respiratory tract only or by proteases from other tissues. This ability is based on the progressive development of mutations that lead to the substitution of the normal amino acids at the point of hemagglutinin hydrolysis by the other basic amino acids that determine the amplification of the spectrum of hydrolysis and activation. Neuraminidase participates in the acquisition of virulence through its capacity to bind to plasminogen and by increasing the concentration of activating proteases. Adaptation to the host, through recognition of the cell receptor, is another factor determining the virulence and interspecies transmission of avian strains. From an epidemiological point of view, viral strains should be subtyped and the activating capacity of hemagglutinin should be determined to identify their degree of virulence.

**Key words:** Influenza. Virulence factors. Hemagglutinin. Neuraminidase.

## Introducción

La gripe es una enfermedad viral causada preferentemente por los virus gripales A y B (virus influenza A y B) que se presenta anualmente como brotes epidémicos con una duración media de 6-8 semanas. La gripe es una enfermedad considerada como benigna, pero con alto índice de morbilidad, sobre todo en las edades extremas de la vida<sup>1,2</sup>.

Las cepas gripales humanas tipo A presentan un genoma ARN monofoliar segmentado formado por 8 segmentos genéticos de distinto tamaño que codifican un total de 10-12 proteínas distintas<sup>1-4</sup>. Desde el punto de vista genético, las cepas gripales presentan una serie de mutaciones puntuales, inducidas por la presión selectiva del sistema inmunológico, que determinan pequeños cambios antigénicos designados como deriva antigénica (origen de las epidemias de la gripe). Este fenómeno es en parte responsable de la necesidad anual de actualizar las vacunas en cada temporada. Además de esto, estos virus son capaces de intercambiar segmentos genómicos con otros virus de diferentes especies animales, en un proceso designado como reassortamiento, produciendo un cambio antigénico profundo y la aparición de una cepa con un subtipo nuevo frente al cual la población humana generalmente carece de memoria inmunológica (origen de las pandemias de gripe)<sup>3,5-7</sup>.

Hasta hace poco tiempo sólo se conocían a nivel molecular los cambios genéticos que determinaban los cambios antigénicos; sin embargo, estos cambios no

Correspondencia: Dr. J. Reina.  
Unidad de Virología. Servicio de Microbiología Clínica.  
Hospital Universitario Son Dureta.  
Andrea Doria, 55. 07014 Palma de Mallorca. España.  
Correo electrónico: jreina@hds.es

Manuscrito recibido el 08-01-2002; aceptado el 08-03-2002.

siempre podían explicar el comportamiento fenotípico (virulencia) de una determinada cepa gripal. La mayoría de estudios realizados básicamente en cepas gripales aviarias, parecen indicar que la virulencia, definida como la capacidad comparativa de una cepa gripal para causar enfermedad a un determinado huésped<sup>8</sup>, es un fenómeno poligénico. Sin embargo, parece demostrado que la hemaglutinina (HA) y la neuraminidasa (NA) y, en especial, los genes que las codifican (genes 4 y 6) desempeñan un papel principal y esencial en la patogenia viral<sup>9-11</sup>. Además de estas proteínas, recientemente se ha comprobado cómo otros genes, y en especial la proteína PB2 (gen 1) también pueden participar de una forma indirecta en la patogenicidad de estos virus<sup>12</sup>.

## Papel patogénico de la hemaglutinina

La HA se designó con este nombre por su capacidad para aglutinar hematíes de diferentes especies animales mediante su unión específica a los receptores celulares que contienen ácido siálico<sup>13</sup>. La HA participa en 3 pasos esenciales del ciclo replicativo del virus gripal: *a*) fijación y unión al receptor (ácido siálico) de la célula huésped; *b*) penetración del virus a través de la membrana celular (fusión con la envoltura viral) y llegada al citoplasma mediante la fusión de la misma con la membrana de la partícula viral endocitada, originando la liberación de los nucleocápsides en el citoplasma celular, y *c*) como antígeno mayor del virus que es expuesto en la superficie de las células infectadas, siendo el principal desencadenante de la producción de anticuerpos neutralizantes<sup>4</sup>.

La HA es una glucoproteína homotrímica (formada por tres subunidades idénticas unidas de forma no covalente) codificada por el gen 4 del virus influenza A, que presenta una secuencia genética de 1.742 a 1.778 nucleótidos, que produce, tras el proceso de transcripción, una molécula polipeptídica de 562 a 566 aminoácidos<sup>14</sup>. La glucoproteína HA se presenta en la partícula viral en una forma precursora (HAo) que precisa de una activación enzimática para producir la forma activa. La hidrólisis enzimática de la HAo determina un cambio conformacional y la creación de un puente disulfuro que mantiene unidas a las dos partes designadas como HA1 (47.000 Da y 319-326 aminoácidos) y HA2 (29.000 Da y 221-222 aminoácidos). Según el subtipo, el proceso hidrolítico determina la pérdida de 1-6 aminoácidos<sup>4,15</sup> (fig. 1).

La activación proteolítica postranscripcional de la molécula precursora HAo, que se produce normalmente por las proteasas del huésped, origina un dominio fusogénico en el extremo aminoterminal de la subunidad HA2 que favorece la fusión entre la envoltura viral y la membrana endosomal del huésped. Esta hidrólisis es, por lo tanto, un requisito esencial previo para que la glucoproteína sea capaz de fijarse al receptor celular; por lo tanto, en el proceso patogénico e inefectivo del virus local y en su capacidad para desarrollar infecciones diseminadas<sup>16-18</sup>.

Las cepas gripales aviarias se clasifican en avirulentas o poco virulentas, causantes de infecciones exclusivamente respiratorias, y virulentas o causantes de infecciones

diseminadas con una elevada mortalidad<sup>18,19</sup>. Una de las diferencias entre ellas es el espectro de enzimas capaces de determinar la hidrólisis proteínica. De este modo, las cepas avirulentas sólo podrían ser hidrolizadas por las proteasas presentes normalmente en la secreción del tracto respiratorio y necesarias en el proceso de fluidificación del moco respiratorio. Por el contrario, las cepas virulentas podrían ser activadas por una gran variedad de enzimas proteolíticas existentes en diferentes órganos o tejidos, permitiendo de este modo la producción de infecciones diseminadas, además de las respiratorias<sup>20</sup>. Estos 2 tipos de cepas se diferencian fácilmente en los cultivos celulares debido a que las cepas virulentas no precisan de la adición exógena de tripsina al medio de cultivo para crecer, y son activadas por las proteasas endógenas de la célula huésped, mientras que en las cepas avirulentas es imprescindible su adición para conseguir el aislamiento<sup>16,21,22</sup>.

De este modo puede decirse que, en el caso del virus gripal, el tropismo tisular no está determinado exclusivamente por la presencia del receptor celular, lo cual parece lógico debido a que el ácido siálico se encuentra en la superficie de un gran número y tipo de células, sino por la presencia tisular de las enzimas con capacidad para activar a la glucoproteína HA (más que restricción de receptor sería restricción de activador enzimático)<sup>4,18,21</sup>.

Cuando se analiza la secuencia aminoácida de las diferentes HA se observa que existen dos características estructurales que determinan su capacidad para ser hidrolizadas: la secuencia aminoácida específica del punto de corte y la existente en la vecindad previa al mismo. Los estudios comparativos entre cepas han demostrado que las cepas con restricción de hidrólisis (avirulentas) generalmente presentan en la zona previa al punto de corte una sola arginina (R), mientras que las virulentas presentan numerosos aminoácidos básicos situados en esta zona (alcalización la secuencia). La mayoría de las cepas gripales tipo A poseen arginina en el extremo carboxilo de la subunidad HA1 y una glicina (G) en el extremo amino de la subunidad HA2, aunque no es infrecuente que también presenten alguna lisina (K) en esta posición<sup>22-25</sup>.

Al analizar la cepa aviar altamente virulenta H5 se ha observado cómo los aminoácidos prolina (P) y glutamina (Q) están localizados muy cerca del extremo carboxilo de

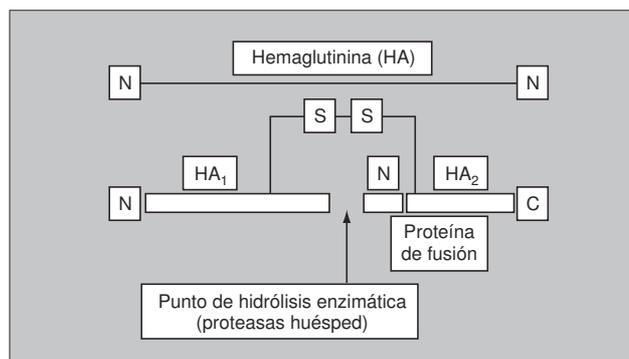
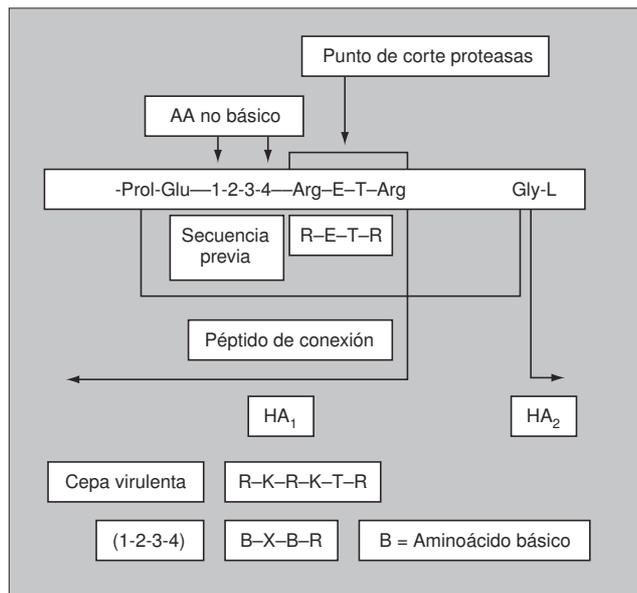


Figura 1. Estructura esquemática de la hemaglutinina (HA) y su proceso de activación proteolítico.



**Figura 2.** Característica del péptido conexión y punto de corte de la hemaglutinina (HA) de una cepa de gripe aviar.

**TABLA 1.** Características patogénicas de las cepas aviarias aisladas en un brote de México

Cepa	Eficiencia de placa (%)	Secuencia punto de corte de la HA
5/94	1-10	Pro-Gln-Arg-Glu-ThrArg/Gly
12/94	< 1	Pro-Gln-Arg-Glu-ThrArg/Gly
11/94	100	Pro-Gln-Arg-Lys-Arg-Lys-ThrArg/Gly
20/95	100	Pro-Gln-Arg-Lys-Arg-Lys-Arg-Lys-ThrArg/Gly

**TABLA 2.** Emergencia de cepas aviarias H5 de alta virulencia en el modelo experimental

Secuencia punto de corte	Número de cepas	Alta virulencia
Pro-Gln-Básico-Glu-Thr-Básico/Gly	9	0
Pro-Gln-Básico-Básico-Thr-Básico/Gly	4	3 (75%)
Pro-Gln-Básico-Básico-Básico-Básico/Gly	6	5 (84%)

Básico: aminoácido básico.

**TABLA 3.** Emergencia de cepas aviarias H7 de alta virulencia en el modelo experimental

Secuencia punto de corte	Número de cepas	Alta virulencia
Pro-Básico-Pro-Básico/Gly	3	0
Pro-Básico-Gly-Básico/Gly	4	0
Pro-Básico-Thr-Básico/Gly	4	0
Pro-Básico-Básico-Básico-Básico/Gly	1	1 (100%)

Básico: aminoácido básico.

la subunidad HA1<sup>26,27</sup>. Entre los aminoácidos Q y G existe una región designada como “péptido y conexión” (fig. 2)<sup>28,29</sup>. La secuencia de esta región puede variar según la cepa

analizada. Así, todas las cepas avirulentas H5 estudiadas presentan los mismos aminoácidos en esta zona, con escasa presencia de los básicos, las cepas virulentas siempre presentan la secuencia B-X-B-R (en la cual B siempre es un aminoácido básico). De esta forma, parece evidente la necesidad inicial de que se produzcan cambios en los aminoácidos situados antes del punto de corte, con introducción por mutación de los de tipo básico, para que el cambio conformacional que produzcan facilite y permita la posterior introducción de nuevos aminoácidos básicos en la zona de reconocimiento de las proteasas (punto de corte)<sup>30,31</sup>. Por lo tanto, la adquisición del carácter virulento de una cepa parece ser un proceso secuencial de sustitución de aminoácidos que va facilitando la aceptación conformacional de nuevas sustituciones. Con todos estos cambios se produce un incremento en el espectro de enzimas proteolíticas (proteasas) con capacidad para activar a la glucoproteína HA e iniciar el proceso infeccioso<sup>32</sup>.

Para demostrar la hipótesis de que las cepas gripales humanas pueden transformarse en altamente virulentas mediante variaciones en la zona de hidrólisis de la HA se han introducido experimentalmente aminoácidos básicos en sus secuencias. Estas cepas mutadas han demostrado su capacidad para ser hidrolizadas por proteasas intracelulares y su no dependencia de tripsina exógena. Además han mantenido su capacidad de crecimiento y patogenicidad, lo cual demuestra que estas mutaciones no afectan al comportamiento general de la cepa, sino que le añaden una característica patogénica nueva sin efecto deletorio sobre las ya existentes<sup>4,20,21,33,34</sup>. Sin embargo, la no existencia, al menos conocida, de cepas humanas con puntos de corte de amplio espectro, parece sugerir la existencia de algunas características estructurales que dificultan su aparición o mantenimiento.

La presencia de múltiples aminoácidos básicos en el punto de corte y los alrededores se caracteriza por una mayor o elevada eficiencia en la formación de placas en el cultivo celular *in vitro*<sup>19,21</sup>. Este fenómeno deriva de la no necesidad de la adición externa de tripsina y la utilización eficiente de las endoproteasas celulares. Estudios *in vitro* sobre cepas aviarias de virulencia variable (tabla 1) han demostrado cómo la adición progresiva de aminoácidos básicos en estas zonas incrementa sustancialmente la eficiencia de placa o de crecimiento *in vitro*<sup>20,21</sup>. Los estudios experimentales iniciales realizados sobre las cepas aviarias H5 de escasa virulencia demostraron que aunque su patogenia inicial era la esperada, tras escasos pases en embriones de pollo producían cepas de elevada virulencia y mortalidad. Al analizar genéticamente estas cepas se observó la introducción de mutaciones puntuales en los puntos de corte con la aparición de aminoácidos básicos<sup>34-36</sup>. Con todo ello puede afirmarse la existencia de una correlación entre este fenómeno *in vitro* (dependiente de la falta de restricción hidrolítica) y la mortalidad de las aves infectadas de forma natural y/o experimental, confirmando que este proceso mutacional es esencial y está obligatoriamente implicado en el grado de virulencia de las cepas gripales de tipo aviar<sup>37,38</sup>.

La importancia de estos cambios genéticos determinando la conversión de una cepa avirulenta a otra virulencia ha inducido a Swaney et al<sup>136,39</sup> a desarrollar un modelo experimental en embriones de pollo de 14 días

capaz de predecir la emergencia de cepas altamente virulentas a partir de las aisladas en las aves. De 27 cepas estudiadas (15 H5 y 10 H7) ocho H5 (53%) y una H7 (10%) presentaron mutaciones puntuales que determinaron el cambio fenotípico de cepas de baja mortalidad a cepas de alta mortalidad (75% de muertes en animales inoculados intravenosamente). En las tablas 2 y 3 se presentan las características de las cepas analizadas. Este modelo parece ser muy eficaz en la predicción de las cepas pertenecientes al subtipo aviar H5 pero presenta dificultades con otros subtipos considerados de alta virulencia (H7). Por lo tanto, este modelo puede ser considerado como poco sensible aunque de elevada especificidad, dado que las cepas que mutan rápidamente en el modelo predicen con seguridad el comportamiento de las cepas *in vivo* cuando infectan a una comunidad aviar. El problema radica básicamente en que sólo se prueban algunas cepas elegidas al azar, mientras que en la situación de campo las cepas se infectan de forma simultánea o continua a millones de huéspedes siendo sometidas a múltiples presiones selectivas. Por lo tanto, la caracterización genética y la secuenciación proteica constituyen las dos únicas herramientas que permiten en la actualidad establecer el comportamiento fenotípico de una cepa aviar<sup>18-21,36-38</sup>.

## Proteasas activadoras de la hemaglutinina

Las enzimas proteolíticas (proteasas) capaces de hidrolizar a la glucoproteína HA y activarla pueden clasificarse genéricamente en 2 grupos<sup>39,40</sup>:

### Enzimas tipo tripsina

Este grupo está constituido por enzimas capaces de hidrolizar HA pertenecientes a cepas avirulentas que presentan tan sólo una arginina en el punto de corte de la glucoproteína, así como a aquellas HA de cepas virulentas con presencia de múltiples residuos básicos en el entorno y punto de corte de la glucoproteína<sup>16,22</sup>.

La mayoría de las cepas aviarias y humanas crecen óptimamente en los huevos embrionados de gallina en los que se ha detectado la presencia una proteasa semejante al factor Xa de la coagulación. Este factor o proteasa pertenece a la familia de la protrombina y es la responsable de la hidrólisis de la HA en el líquido alantoideo, permitiendo al virus influenza replicarse en el huevo embrionado<sup>41</sup>.

Una actividad enzimática semejante se ha descrito en las células Clara que residen en el epitelio bronquial de las ratas<sup>42</sup>. Este tipo de proteasas no se han podido identificar todavía en el tracto respiratorio humano y aviar. Las células Clara no parecen ser muy abundantes en el tracto respiratorio humano, lo cual hace pensar que su función en el ser humano debe ser poco relevante<sup>39,40</sup>.

Existen diferentes proteasas de origen bacteriano con capacidad directa o indirecta de activar enzimáticamente las HA. Así las proteasas de serina secretadas por algunas bacterias como *S. aureus* presentan capacidad para hidrolizar las HA con una única arginina a nivel del punto de corte tanto *in vitro* como en los pulmones de ratón<sup>43</sup>. Este fenómeno, junto al de la activación indirecta de la NA, podrían explicar la elevada frecuencia de aparición de

neumonías después de las infecciones mixtas bacteria-virus<sup>44</sup>.

Finalmente, debe mencionarse que aunque la mayoría de las cepas aviarias avirulentas se replican en el intestino de las aves (reservorio natural) todavía no han podido identificarse las proteasas fisiológicas que se encargan de activar las HA de estas cepas<sup>10,39,40</sup>.

### Enzimas dependientes del calcio

Este grupo está constituido por proteasas que sólo son capaces de activar las cepas virulentas con presencia de numerosos residuos básicos en el entorno y punto de corte de la glucoproteína HA. Conceptualmente, este grupo debe ser muy amplio y ampliamente distribuido (ubicuo) debido a que las cepas virulentas se caracterizan por su capacidad para infectar la mayoría de órganos y tejidos del huésped. Estas proteasas parecen localizarse en el aparato de Golgi de las células eucariotas y se caracterizan fisiológicamente por ser dependientes de calcio y presentar un pH óptimo de tipo ácido<sup>45</sup>. Uno de los grupos enzimáticos más estudiados han sido las endoproteasas subtilisin-relacionadas, como la furina, codificada genéticamente por el gen *fur*<sup>46,47</sup>. La furina fue descrita por Stieneke-Grober et al<sup>48</sup> como una enzima ampliamente distribuida en las células eucariotas con capacidad para hidrolizar las HA de las cepas aviarias virulentas a través del reconocimiento de la secuencia B-X-B-R. Otra endoproteasa con actividad hidrolítica sobre cepas virulentas es la designada como PC6 por Horimoto et al<sup>49</sup>. Esta proteasa está expresada en muchos tejidos y sólo es capaz de activar las cepas virulentas con múltiples residuos básicos en la zona de corte hidrolítico (fig. 3).

## Papel patogénico de la neuraminidasa

La glucoproteína NA es un homotetrámero (20.000 Da) formado por un dominio globular que constituye el centro enzimático activo y una prolongación longitudinal que lo mantiene unido a la envoltura viral. Esta enzima viene codificada por el gen 6 del virus que presenta una longitud de unos 1.414 nucleótidos, lo cual determina una poliproteína de unos 453 residuos aminoácidos<sup>3,4</sup>. La NA es una enzima (acilneuraminil-hidrolasa) que cataliza e hidroliza las uniones alfa-2,6-galactosídico entre un ácido siálico terminal y una D-galactosa o D-galactosamina adyacentes<sup>50</sup>. Las principales funciones conocidas de la NA son la eliminación de los residuos de ácido siálico de la HA, HA y superficie celular favoreciendo la liberación de las partículas virales y su propagación y expansión a otras células (difusión-infección)<sup>51,52</sup>. También participa en el transporte del virus a través de la mucina presente en el tracto respiratorio, permitiendo la llegada del virus a otras células epiteliales (expansión-infección)<sup>50-54</sup>.

Estudios recientes, basados en datos previos<sup>55</sup>, han descrito un nuevo mecanismo de virulencia asociado a la NA de algunas cepas aviarias<sup>56</sup>. Esta glucoproteína se uniría y secuestraría al plasminógeno, el precursor de la plasmina, incrementando la concentración local de proteasas. Debido a la ubicuidad del plasminógeno, las cepas con esta capacidad podrían utilizar la plasmina presente en cualquier tejido ampliando de este modo el

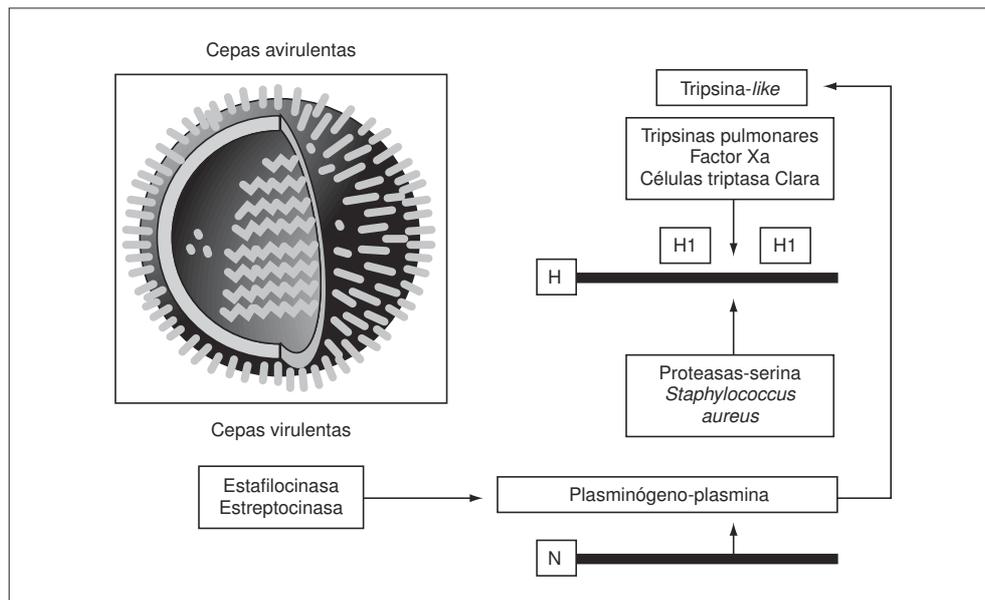


Figura 3. Factores activadores de la hemaglutinina (H) y neuraminidasa (N) de los virus gripales aviarios tipo A subtipos H5 y H7.

espectro patogénico de la misma (fig. 3). Por lo tanto, la capacidad de la NA para unirse al plasminógeno representa un nuevo factor de virulencia para las cepas gripales de origen aviar.

## Mecanismos de adquisición de virulencia

Entre las cepas aviarias existen subtipos del virus influenza A reconocidos como virulentos (H5 y H7), y otros no virulentos o con patogenicidad esperada. En 1993 (Pennsylvania, cepa H5N2) y 1994-1995 (México, cepa H5N2) se produjeron 2 brotes de gripe aviar caracterizados por una mortalidad excesiva no esperada<sup>21,26,57,58</sup>. El análisis genético y de secuencia aminoácida de las HA de estos brotes y de las cepas causantes de brotes previos permitieron explicar el motivo de esta mayor virulencia en estas cepas previamente consideradas como avirulentas<sup>57,58</sup>. Estos estudios demostraron la importancia de la secuencia aminoácida del punto de corte enzimático y del entorno previo al mismo y cómo las mutaciones genéticas que determinaban la sustitución de los aminoácidos existentes por otros básicos eran los verdaderos responsables del cambio de comportamiento patogénico de la cepa<sup>36,58-60</sup>.

Parece ya evidente en la actualidad que el incremento en el espectro de activación proteolítica es el principal factor de virulencia de la glucoproteína HA de las cepas aviarias. Puesto que sólo es necesario un número pequeño y limitado de mutaciones para convertir a una cepa en virulenta, parece lógico pensar que el mecanismo esencial de este cambio sea la introducción de las mutaciones por errores de la ARN-polimerasa seguida por la selección natural de las cepas de amplio espectro hidrolítico por sus ventajas de propagación y supervivencia en el huésped<sup>59,61</sup>.

El hecho de que las cepas mutantes virulentas puedan ser seleccionadas rápidamente en los huevos embrionados de 14 días de edad pero no en los de 10 días parece indicar el posible mecanismo de selección. Las cepas virulentas predominan después de sólo tres pases de una cepa

avirulenta en los embriones

de 14 días, indicando una ventaja replicativa selectiva que favorece su predominio en los huevos más maduros<sup>36,39,62</sup>.

Un proceso todavía no aclarado es el del establecimiento del mecanismo genético que permite la adquisición de numerosos residuos básicos en la zona de corte de la HA. Perdue et al<sup>63</sup> han postulado la posibilidad de una duplicación genética de una parte de la región rica en purinas existente en el punto de corte. Mientras que Orlich et al<sup>64</sup> parecen proponer que un proceso de recombinación ARN que originase la inserción del ARN 28S de la célula huésped o del propio gen viral NP<sup>65</sup> en una zona situada por encima y, por lo tanto, en el entorno del punto de corte produciría la obtención de HA altamente hidrolizables. Sin embargo, ninguna de las 2 hipótesis han podido ser demostradas o confirmadas en las cepas naturales analizadas.

## Restricción de huésped

Los diferentes estudios epidemiológicos y ecológicos han demostrado que todas las cepas gripales se originan y mantienen en una población animal concreta: las aves acuáticas. A partir de ellas, y actuando como reservorio natural, estas cepas se transmiten a otros grupos animales (aves domésticas, cerdos, caballos, mamíferos acuáticos) y ser humano<sup>1-5</sup>.

Aunque se producen una frecuente transmisión interespecies entre las cepas aviarias y otros grupos animales, parece existir una importante restricción de huésped que delimita biológicamente este proceso<sup>2,5</sup>. En términos generales, las cepas aviarias no se replican eficientemente en los seres humanos o en los primates<sup>66,67</sup>; de forma análoga, las cepas humanas no crecen en los ánales<sup>68,69</sup>. Algunos estudios parecían haber demostrado la necesidad previa de adaptación de las cepas aviarias al cerdo para posteriormente ser capaces de infectar al ser humano<sup>6,7</sup>. Sin embargo, el brote epidémico de Hong-Kong (H5N1) demostró la posibilidad de infección directa de las

aves al ser humano, a pesar de la posible restricción química de huésped existente entre las 2 especies<sup>6,7,12</sup>.

Todavía no se conocen con exactitud cuáles son todos los factores que establecen de una forma específica esta restricción de huésped, pero sí parece claro el papel de las 2 glucoproteínas de superficie (HA y NA) de las cepas gripales y los diferentes compuestos químicos que configuran el receptor celular de las células huéspedes<sup>3,4</sup>.

### Hemaglutinina

La HA se constituye como el principal factor limitante del espectro infectivo de las cepas gripales mientras que es la encargada del reconocimiento del huésped<sup>2,4</sup>. La especificidad (y composición) del receptor celular para las cepas gripales varía en función del origen animal de las células. En los seres humanos, las cepas gripales reconocen preferentemente los receptores que contienen sialiloligosacáridos terminados con un ácido N-acetilsialico unido a una galactosa mediante un enlace de tipo ( $\alpha$ 2,6) (NeuAc $\alpha$ 2,6Gal)<sup>70-73</sup>. Por otro lado, las cepas gripales aviarias y equinas reconocen preferentemente al receptor formado por un ácido N-acetilsialico unido a una galactosa mediante un enlace de tipo ( $\alpha$ 2,3) (NeuAc $\alpha$ 2,3Gal)<sup>73-75</sup>.

Como consecuencia de ello, las diferentes cepas gripales infectan diferentes tejidos orgánicos en las distintas especies en función del predominio y/o presencia de estos tipos de receptores celulares. Así, las células del epitelio respiratorio humano contienen predominantemente restos de NeuAc $\alpha$ 2,6Gal<sup>76</sup>, mientras que en el tracto respiratorio de los caballos y el tracto intestinal de los patos (en donde se replican las cepas aviarias) contienen predominantemente restos de NeuAc $\alpha$ 2,3Gal<sup>77</sup>. Curiosamente, el tracto respiratorio de los cerdos contiene ambos tipos de receptores<sup>77</sup>, lo cual explica la susceptibilidad de estos animales, tanto a las cepas aviarias como humanas<sup>76-79</sup>.

Así pues, uno de los factores que determinan la susceptibilidad o restricción de huésped para las cepas gripales es la presencia de estos restos siálicos en las diferentes células y tejidos de una determinada especie animal. Estas diferencias de especificidad vienen básicamente determinadas por parte de la cepa gripal, por la estructura y secuencia de la zona de la HA implicada en la unión al receptor celular. Así, la presencia de leucina en la posición 226 del subtipo humano H3, en vez de glicina como contienen las cepas aviarias y equinas, le confiere especificidad para unirse al receptor formado por la NeuAc $\alpha$ 2,6Gal<sup>78,79</sup>.

### Neuraminidasa

La glucoproteína NA parece desempeñar un papel discriminador en el proceso de restricción del huésped<sup>50-52,69</sup>. Así, una cepa reasortante que contenga todos los genes de una cepa aviar pero conserve el gen humano de la NA, no es capaz de crecer en esta especie animal<sup>69</sup>. A diferencia de la HA, la restricción de huésped (especificidad) impuesta por la NA no parece ser tan restrictiva y evoluciona de una forma mucho más rápida adaptándose a la nueva especie animal. Así, por ejemplo, la NA N2 aviar que reconoce básicamente el receptor NeuAc $\alpha$ 2,3Gal es capaz de adquirir la especificidad humana (NeuAc $\alpha$ 2,6Gal) durante su evolución natural en cultivos celulares de origen humano<sup>74,80</sup>.

### Otras proteínas

Aunque por ahora parece que las 2 glucoproteínas antes mencionadas (productos de los genes 4 y 6) son las principales responsables de la especificidad de huésped para las diferentes cepas gripales, otros genes de estos virus y sus proteínas podrían estar también directamente implicados. Así, algunos estudios experimentales parecen indicar que la nucleoproteína (NP) desempeñaría algún papel en la restricción de huésped, aunque sin conocer su mecanismo de acción<sup>81</sup>.

Recientemente, Hatta et al<sup>12</sup> han realizado un estudio sobre las bases moleculares de las cepas aviarias altamente virulentas pertenecientes al subtipo H5N1 causantes del brote epidémico de Hong-Kong en 1997. Como ya se ha mencionado, en general las cepas gripales humanas apenas producen enfermedad cuando se inoculan en los ratones<sup>82-84</sup>; sin embargo, las cepas H5N1 aisladas en humanos en el brote epidémico anteriormente mencionado, que se caracterizó por una mortalidad humana del 33% e incapacidad para la transmisión persona-persona producían una elevada mortalidad en este modelo experimental<sup>85</sup>. Analizando molecularmente las cepas H5N1 de alta virulencia y las de baja virulencia se comprobó la existencia de pequeñas variaciones en la secuencia aminoácida de la proteína PB2<sup>12,86</sup>.

La proteína PB2 forma parte junto a la PB1 y PA del complejo transcripcional de los virus gripales. Está codificada por el gen 1 (2.341 nucleótidos) y corresponde a una proteína de unos 759 aminoácidos (85.700 Da)<sup>3,4</sup>. Los análisis moleculares han observado 2 cambios entre las PB2 de las cepas de alta y baja virulencia; así: *a*) la sustitución de una serina por una isoleucina en la posición 227 determina una reducción significativa de la virulencia de la cepa, y *b*) la sustitución de una lisina por un ácido glutámico en la posición 627 determina un incremento significativo de la virulencia del modelo murino. Por lo tanto, las cepas de alta virulencia se caracterizarían por presentar en la PB2 una isoleucina en la posición 227 y un ácido glutámico en la posición 627. Sin embargo, estos cambios, debidos a mutaciones puntuales, no son suficientes para modificar el comportamiento fenotípico de una cepa y deben ir siempre acompañados de las mutaciones ya descritas en el punto de corte y vecindad de la glucoproteína HA que le determinan una ampliación en el espectro hidrolítico de la misma<sup>12</sup>.

En definitiva, y a la vista de los conocimientos moleculares, los laboratorios dedicados a la gripe van a tener no sólo que encargarse de la caracterización antigénica (tipado y subtipado) de las cepas aisladas, sino determinar su fenotipo o virulencia. Este último aspecto puede evaluarse provisionalmente a través de la demostración de la capacidad de crecimiento en cultivos celulares de una cepa gripal en ausencia de la adición externa de tripsina al medio de cultivo. Aunque la demostración definitiva del grado de virulencia requiere la secuenciación genética (gen 4) o aminoácida (glucoproteína HA) de los factores de virulencia implicados en este proceso.

## Bibliografía

- Hayden FG, Palese P. Influenza virus. En: Richman DD, Whitley RJ, Hayden FG, editors. *Clinical virology*. New York: Churchill Livingstone, 1997; p. 911-42.
- Ito T, Kawaoka Y. Avian influenza. En: Nicholson KG, Webster RG, Hay AJ, editors. *Textbook of influenza*. Oxford: Blackwell Science, 1998; p. 126-36.
- Wright PF, Webster RG. Orthomyxoviruses. En: Knipe DM, Howley PM, editors. *Fields virology*, 4<sup>a</sup> ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 2001; p. 1533-79.
- Lamb RA, Krug RM. Orthomyxoviridae: The viruses and their replication. En: Knipe DM, Howley PM, editors. *Fields virology*, 4<sup>a</sup> ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 2001; p. 1487-532.
- Webster RG, Bean WJ, Gorman OT, Chambers TM, Kawaoka Y. Evolution and ecology of influenza A viruses. *Microbiol Rev* 1992;56:152-79.
- Webster RG. Predictions for future human influenza pandemics. *J Infect Dis* 1997;176(S1):S14-9.
- Reina Prieto J, Ballesteros Martínez F. La gripe en el siglo XXI: preparándonos para una nueva pandemia. *Rev Clin Esp* 2000;200:113-5.
- Tyler KL, Nathanson N. Pathogenesis of viral infections. En: Knipe DM, Howley PM, editors. *Fields virology*, 4<sup>a</sup> ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 2001; p. 199-243.
- Webster RG, Bean WJ, Gorman OT, Chambers TM, Kawaoka Y. Evolution and ecology of influenza A viruses. *Microbiol Rev* 1992;56:152-79.
- Horimoto T, Kawaoka Y. Pandemic threat posed by avian influenza A viruses. *Clin Microbiol Rev* 2001;14:129-49.
- Webster RG. A molecular whodunit. *Science* 2001;293:1774-5.
- Hatta M, Gao P, Halfmann P, Kawaoka Y. Molecular basis for high virulence of Hong Kong H5N1 influenza A viruses. *Science* 2001;293:1840-2.
- Hirst GK. Agglutination of red cells by allantoic fluid of chick embryos infected with influenza virus. *Science* 1941;94:22-3.
- Porter AG, Barber C, Carey NH. Complete nucleotide sequence of an influenza virus hemagglutinin gene from cloned DNA. *Nature* 1979;282:471-7.
- Steinhauer DA. Role of hemagglutinin cleavage for the pathogenicity of influenza virus. *Virology* 1975;258:1-20.
- Klenk HD, Rott R, Orlich M, Blodorn J. Activation of influenza A viruses by trypsin treatment. *Virology* 1975;68:426-39.
- Lazarowitz SG, Choppin PW. Enhancement of the infectivity of influenza A and B viruses by proteolytic cleavage of the hemagglutinin polypeptide. *Virology* 1975;68:440-54.
- Garten W, Klenk HD. Understanding influenza virus pathogenicity. *Trends Microbiol* 1999;7:99-100.
- Swayne DE, Suarez DL. Highly pathogenic avian influenza. *Rev Sci Tech Off Int Epiz* 2000;19:463-82.
- Perdue ML. How can a virus suddenly become very pathogenic? *World Poultry Special Issue* 2000;2000:9-10.
- Swayne DE, Suarez DL. Evolution and pathobiology of avian influenza virus virulence in domestic birds. En: Dodet B, Vicari M, editors. *Emergence and control of zoonotic ortho- and paramyxovirus diseases*. Paris: John Libbey Eurotext, 2001; p. 35-42.
- Tobita K, Sugiura A, Enomoto C, Furuyama M. Plaque assay and primary isolation of influenza A viruses in an established line of canine kidney cells (MDCK) in the presence of trypsin. *Med Microbiol Immunol* 1975;162:9-14.
- Bosch FX, Orlich M, Klenk HD, Rott R. The structure of the hemagglutinin, a determinant for the pathogenicity of influenza viruses. *Virology* 1979;95:197-207.
- Bosch FX, Garten W, Klenk HD, Rott R. Proteolytic cleavage of influenza virus hemagglutinin: Primary structure of the connecting peptide between HA1 and HA2 determines proteolytic cleavability and pathogenicity of avian influenza viruses. *Virology* 1981;113:725-35.
- Günther I, Glatthaar B, Döller G, Garten W. A H1 hemagglutinin of a human influenza A virus with a carbohydrate-modulated receptor binding site and an unusual cleavage site. *Virus Res* 1993;27:147-60.
- Senne DA, Panigraphy B, Kawaoka Y, Pearson JE, Süß J, Lipkind M, et al. Survey of the hemagglutinin (HA) cleavage site sequence of H5 and H7 avian influenza viruses: amino acid sequence at the HA cleavage site as a marker of pathogenicity potential. *Avian Dis* 1996;40:425-37.
- Kawaoka Y, Webster RG. Sequence requirement for cleavage activation of influenza virus hemagglutinin expressed in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 1988;85:324-8.
- Katz JM, Lu X, Tumpey TM, Smith CB, Shaw MW, Subbarao K. Molecular correlates of influenza A H5N1 pathogenesis in mice. *J Virol* 2000;74:1807-10.
- Kawaoka Y, Webster RG. Interplay between carbohydrate in the stalk and the length of the connecting peptide determines the cleavability of influenza virus hemagglutinin. *J Virol* 1989;63:3296-300.
- Shortridge KF, Peiris M, Guan Y, Dyrting K, Ellis T, Sims L. H5N1 virus: Beaten, but is it vanquished? En: Dodet B, Vicari M, editors. *Emergence and control of zoonotic ortho- and paramyxovirus diseases*. Paris: John Libbey Eurotext, 2001; p. 91-7.
- Horimoto T, Kawaoka Y. Reverse genetics provides direct evidence for a correlation of hemagglutinin cleavability and virulence of an avian influenza A virus. *J Virol* 1994;68:3120-8.
- Garten W, Klenk HD. Characterization of the carboxypeptidase involved in the proteolytic cleavage of the influenza hemagglutinin. *Intervirology* 1983;20:181-9.
- Kawaoka Y. Structural features influencing hemagglutinin cleavability in a human influenza A virus. *J Virol* 1991;65:1195-201.
- Ohuchi R, Ohuchi M, Garten W, Klenk HD. Human influenza virus hemagglutinin with high sensitivity to proteolytic activation. *J Virol* 1991;3530-7.
- Perdue ML, Garcia M, Beck J, Brugh M, Swayne DE. An Arg-Lys insertion at the hemagglutinin cleavage site of an H5N2 avian influenza isolate. *Virus Genes* 1996;12:77-84.
- Swayne DE, Perdue ML, Garcia M, Rivera-Cruz E, Brugh M. Pathogenicity and diagnosis of H5N2 mexican avian influenza viruses in chickens. *Avian Dis* 1997;41:335-46.
- Pearson JE. Report of the Committee on transmissible diseases of poultry and other avian species. *Avian influenza*. En: Proc 98th Ann Meet US Animal Health Assoc. Richmon: US Animal Health Association, 1998; p. 519-21.
- Swayne DE, Beck JR, Garcia M, Perdue ML, Brugh M. Pathogenicity shifts in experimental avian influenza virus infections. En: Proc 4th Intl Symp Avian Influenza. Richmon: US Animal Health Association, 1998; p. 171-81.
- Klenk HD, Garten W. Host cell proteases controlling virus pathogenicity. *Trends Microbiol* 1994;2:39-43.
- Rott R, Klenk HD, Nagai Y, Tashiro M. Influenza viruses, cell enzymes and pathogenicity. *Am J Respir Crit Care Med* 1995;152:S16-9.
- Gotoh B, Ogasawara T, Toyoda T, Inocencio NM, Hamaguchi M, Nagai Y. An endoprotease homologous to the blood clotting factor X as a determinant of viral tropism in chick embryo. *EMBO J* 1990;9:4189-95.
- Kido H, Yokogoshi Y, Sakai K, Tashiro M, Kishino Y, Fukutomi A, et al. Isolation and characterization of a novel trypsin-like protease found in rat bronchiolar epithelial Clara cells. A possible activator of the viral fusion glycoprotein. *J Biol Chem* 1992;267:13573-9.
- Tashiro M, Ciborowski P, Klenk HD, Pulverer G, Rott R. Role of *Staphylococcus* protease in the development of influenza pneumonia. *Nature (London)* 1987;325:536-7.
- Scheiblaue H, Reinacher M, Tashiro M, Rott R. Interactions between bacteria and influenza A virus in the development of influenza pneumonia. *J Infect Dis* 1992;166:783-91.
- Walker JA, Sakaguchi T, Matsuda Y, Yoshida T, Kawaoka Y. Location and character of the cellular enzyme that cleaves the hemagglutinin of a virulent avian influenza virus. *Virology* 1992;190:278-87.
- Barr PJ. Mammalian subtilisins: The long-sought dibasic processing endoproteases. *Cell* 1991;66:1-3.
- Seidah NG, Chretien M. Eukariotic protein processing: Endoproteolysis of precursor proteins. *Curr Opin Biotechnol* 1997;8:602-7.
- Stieneke-Grober AM, Vey M, Angliker H, Shaw E, Thomas G, Roberts C, et al. Influenza virus hemagglutinin with multibasic cleavage site is activated by furin, a subtilisin-like endoprotease. *EMBO J* 1992;11:2407-14.
- Horimoto T, Nakayama K, Smeekens SP, Kawaoka Y. Pro-protein-processing endoproteases PC6 and furin both activate hemagglutinin of virulent avian influenza viruses. *J Virol* 1994;68:6074-8.
- Gottschalk A. The specific enzyme of influenza virus and *Vibrio cholerae*. *Biochim Biophys Acta* 1957;23:645-6.
- Palese P, Tobita K, Ueda M, Compans RW. Characterization of temperature sensitive influenza mutants defective in neuraminidase. *Virology* 1974;61:397-410.
- Leaver WG, Colman PM, Webster RG. Influenza virus neuraminidase with hemagglutinin activity. *Virology* 1984;137:314-23.
- Hausmann J, Kretzschmar E, Garten W, Klenk HD. N1 neuraminidase of influenza virus A/FPV/Rostock/34 has haemadsorbing activity. *J Gen Virol* 1995;76:1719-28.
- Kobasa D, Rodgers ME, Wells K, Kawaoka Y. Neuraminidase hemadsorption activity, conserved in avian influenza A viruses, does not influence viral replication in ducks. *J Virol* 1997;71:6706-13.
- Goto H, Kawaoka Y. A novel mechanism for the acquisition of virulence by a human influenza A virus. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 1998;95:10224-8.
- Lazarowitz SG, Goldberg AR, Choppin PW. Proteolytic cleavage by plasmin of the HA polypeptide of influenza virus: host cell activation of serum plasminogen. *Virology* 1973;56:172-80.

57. Saito T, Horimoto T, Kawaoka Y, Senne DA, Webster RG. Emergence of a potentially pathogenic H5N2 influenza virus in chickens. *Virology* 1994;201:277-84.
58. Chillaud T. Risk factors for recent influenza virus disease outbreaks in animals. En: Dodet B, Vicari M, editors. Emergence and control of zoonotic ortho- and paramyxovirus diseases. Paris: John Libbey Eurotext, 2001; p. 65-72.
59. Horimoto T, Rivera E, Pearson J, Senne D, Krauss S, Kawaoka Y, et al. Origin and molecular changes associated with emergence of a highly pathogenic H5N2 influenza virus in Mexico. *Virology* 1995;213:223-30.
60. Garcia M, Crawford JM, Latimer JW, Rivera-Cruz E, Perdue ML. Heterogeneity in the hemagglutinin gene and emergence of the highly pathogenic phenotype among recent H5N2 avian influenza viruses from Mexico. *J Gen Virol* 1996;77:1493-504.
61. Ohuchi M, Orlich M, Ohuchi R, Simpson BEJ, Garten W, Klenk HD, et al. Mutations at the cleavage site of the hemagglutinin alter the pathogenicity of influenza virus A/chick/Penn/83 (H5N2). *Virology* 1989;168:274-80.
62. Harimoto T, Kawaoka Y. Molecular changes in virulent mutants arising from avirulent avian influenza viruses during replication in 14-day-old embryonated eggs. *Virology* 1995;206:755-9.
63. Perdue ML, Garcia M, Senne D. Virulence-associated sequence duplication at the hemagglutinin cleavage site of avian influenza viruses. *Virus Res* 1997;49:173-86.
64. Orlich M, Gottwald H, Rott R. Nonhomologous recombination between the hemagglutinin gene and the nucleoprotein gene of an influenza virus. *Virology* 1994;204:462-5.
65. Khatchikian D, Orlich M, Rott R. Increased viral pathogenicity after insertion of a 28S ribosomal RNA sequence into the hemagglutinin gene of an influenza virus. *Nature (London)* 1989;340:156-7.
66. Murphy BR, Hinshaw VS, Sly DL, London WT, Hosier NT, Wood FT, et al. Virulence of avian influenza A viruses for squirrel monkeys. *Infect Immun* 1982;37:1119-26.
67. Beare AS, Webster RG. Replication of avian influenza viruses in humans. *Arch Virol* 1991;119:37-42.
68. Hinshaw VS, Webster RG, Turner B. The perpetuation of orthomyxoviruses and paramyxoviruses in Canadian waterfowl. *Can J Microbiol* 1980;26:622-9.
69. Hinshaw VS, Webster RG, Neave CW, Murphy BR. Altered tissue tropism of human avian reassortant influenza viruses. *Virology* 1983;128:260-3.
70. Connor RJ, Kawoda Y, Webster RG, Paulson JC. Receptor specificity in human, avian and equine H2 and H3 influenza virus isolates. *Virology* 1994;205:17-23.
71. Suzuki Y. Gangliosides as influenza virus receptors. Variation of influenza viruses and their recognition of the receptor sialo-sugar chains. *Prog Lipid Res* 1994;33:429-57.
72. Gambaryan AS, Tuzikov AB, Piskarev VE, Yamnikova SS, Lvov DK, Robertson JS, et al. Specification of receptor-binding phenotypes of influenza virus isolates from different hosts using synthetic sialylglycopolymers: Non-egg-adapted human H1 and H3 influenza A and influenza B viruses share a common high binding affinity for 6'-sialyl (N-acetyl)lactosamine. *Virology* 1997;232:345-50.
73. Matrosovich MN, Gambaryan AS, Teneberg S, Piskarev VE, Yamnikova SS, Lvov DK, et al. Avian influenza A viruses differ from human viruses by recognition of sialyloligosaccharides and gangliosides and by a higher conservation of the HA receptor-binding site. *Virology* 1997;233:224-34.
74. Rogers GN, Pritchett TJ, Lane JL, Paulson JC. Differential sensitivity of human, avian and equine influenza A viruses to glycoprotein inhibitor of infection: selection of receptor specific variants. *Virology* 1983;131:394-408.
75. Rogers GN, Paulson JC. Receptor determinants of human and animal influenza virus isolates: Differences in receptor specificity of the H3 hemagglutinin based on species of origin. *Virology* 1983;127:361-73.
76. Cruzeiro JS, Paulson JC, Baum LG. Influenza virus strains selectively recognize sialoligosaccharides on human respiratory epithelium: The role of the host cell in selection of hemagglutinin receptor specificity. *Virus Res* 1993;29:155-65.
77. Ito T, Cruzeiro JS, Kelm S, Baum LG, Krauss S, Castrucci MR, et al. Molecular basis for the generation in pigs of influenza A viruses with pandemic potential. *J Gen Virol* 1998;79:7367-73.
78. Rogers GN, Paulson JC, Daniels RS, Skehel JJ, Wilson IA, Wiley DC. Single amino acid substitutions in influenza hemagglutinin change receptor binding specificity. *Nature (London)* 1983;304:76-8.
79. Naeve CW, Hinshaw VS, Webster RG. Mutations in the hemagglutinin receptor-binding site can change the biological properties of an influenza virus. *J Virol* 1984;51:567-9.
80. Baum LG, Paulson JC. The N2 neuraminidase of human influenza virus has acquired a substrate specificity complementary to the hemagglutinin receptor specificity. *Virology* 1991;180:10-5.
81. Snyder MH, Bucker-White AJ, London WT, Tierney EL, Murphy BR. The avian influenza virus nucleoprotein gene and specific constellation of avian and human virus polymerase genes each specify attenuation of avian/human influenza A/Pintail/79 reassortant viruses from monkeys. *J Virol* 1987;61:2857-63.
82. Suarez DL, Perdue ML, Cox N, Rowe T, Bender C, Huang J, Swayne DE. Comparisons of highly virulent H5N1 influenza A viruses isolated from humans and chickens from Hong Kong. *J Virol* 1998;72:6678-88.
83. Gao P, Watanabe S, Ito T, Goto H, Wells K, McGregor M, et al. Biological heterogeneity, including systemic replication in mice, of H5N1 influenza A virus isolates from humans in Hong Kong. *J Virol* 1999;73:3184-9.
84. Lu XH, Tumpey TM, Morken T, Zaki SR, Cox NJ, Katz JM. A mouse model for the evaluation of pathogenesis and immunity to influenza A (H5N1) viruses isolated from humans. *J Virol* 1999;73:5903-11.
85. Subbarao EK, Klimov A, Katz J, Regenerly H, Lim W, Hall H, et al. Characterization of an avian influenza A (H5N1) virus isolated from a child with a fatal respiratory illness. *Science* 1998;279:393-6.
86. Subbarao EK, London W, Murphy BR. A single amino acid in the PB2 gene of influenza A virus is a determinant of host range. *J Virol* 1993;67:1761-4.