



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Química

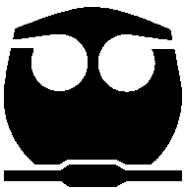
Caracterización fenotípica de células mononucleares de sangre periférica durante el fenómeno inflamatorio agudo en pacientes infectados por el virus de influenza humana A (H1N1) durante el brote inicial de abril-mayo de 2009

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

PRESENTA

PABLO NÚRIBAN VALERO PACHECO



MÉXICO, D.F.

2010



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: PROFESOR: RODOLFO PASTELÍN PALACIOS

VOCAL: PROFESOR: CONSTANTINO III ROBERTO LÓPEZ MACÍAS

SECRETARIO: PROFESOR: LAURA CECILIA BONIFAZ ALFONZO

1ER. SUPLENTE: PROFESOR: MÓNICA BERENICE HERAS CHAVARRÍA

2° SUPLENTE: PROFESOR: NOHEMÍ SALINAS JAZMÍN

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

UNIDAD DE INVESTIGACIÓN MÉDICA EN INMUNOQUÍMICA (UIMIQ), HOSPITAL DE ESPECIALIDADES, CENTRO MÉDICO NACIONAL SIGLO XXI, INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL (IMSS).

ASESOR DEL TEMA: DR. CONSTANTINO III ROBERTO LÓPEZ MACÍAS

(NOMBRE Y FIRMA)

SUPERVISOR TÉCNICO: DRA. LOURDES ANDREA ARRIAGA PIZANO

(NOMBRE Y FIRMA)

SUSTENTANTE: VALERO PACHECO PABLO NÚRIBAN

(NOMBRE Y FIRMA)

DEDICATORIAS

A toda mi familia, en especial, a mis padres Pablo y Patricia, y a mis hermanas Perla y Paola por su gran cariño y su incondicional e invaluable apoyo que me han dado a lo largo de mi vida.

A ustedes les debo lo que soy.

Los amo.

A mi mejor amigo Alberto Dávila; gracias por tantos años de amistad y por tu apoyo incondicional.

Un abrazo Pala.

A mis queridos amigos Mariana, Nayely, José Francisco y Manuel; gracias por su amistad, sigamos creciendo juntos en esta nueva etapa de nuestras vidas.

Los quiero mucho *kanaleros*.

A mi gran amiga María Fernanda Flores, gracias por tus consejos, tu apoyo incondicional, y tu valiosa amistad. Continuemos unidos a lo largo de los diferentes caminos que tomemos.

Te quiero mucho Ferchi.

A Alberto Bernal, gracias por tu comprensión, tu afecto y tu apoyo.

Te aprecio mucho Beto.

A la profesora Gabriela Gutiérrez Chávez (q. e. p. d.) por haber sido la primera persona en introducirme al maravilloso mundo de la química hace ya algunos años.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Armando Isibasi por permitirme formar parte de este Laboratorio y participar en este trabajo, además de su confianza y sus valiosos consejos.

Al Dr. Constantino López Macías por su confianza, su consejo e instrucción, y por enseñarme que “nada es imposible”.

A la Dra. Lourdes Arriaga por su consejo, instrucción y apoyo en la realización de esta Tesis.

Al Dr. Eduardo Ferat por sus consejos y apoyo en la realización de este trabajo.

A la Dra. Laura Bonifaz y al Dr. Rodolfo Pastelín por sus valiosas contribuciones a la mejora de este trabajo.

Al Dr. Haiko Nellen, Dr. Fernando Laredo, Dr. José Malagón y al Dr. Fernando Lozano del Servicio de Medicina Interna del Hospital de Especialidades del CMN S.XXI por su inquebrantable vocación y empeño puestos en la atención de los pacientes durante el inicio de la epidemia.

A Dr. Bernardo Lozano de Laboratorios Avi-Mex S.A. de C.V así como al MVZ MM Horacio Lara y en especial al MVZ Francisco Quezada por su incondicional apoyo,.

A la Dra. Clara Espitia y al MVZ M en C Antonio Vallecillo del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM por las facilidades otorgadas para el desarrollo del proyecto en conjunto.

Al EBC QFB Julio César Martínez y al Banco Central de Sangre del CMN S.XXI por su valioso apoyo al proyecto en conjunto.

A mis compañeros de la UIMIQ en especial a los M en C Ismael Mancilla, Jacqueline Oliva y Javier Sánchez; a los QFB Marisol Pérez, Adriana Núñez y Raúl Montecillo y al pQFB Esteban Domínguez por sus valiosas observaciones a este trabajo y por su constante apoyo.

A la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México, de la que me enorgullece ser egresado y a la cual agradezco haberme formado profesionalmente.

FINANCIAMIENTO

- Proyecto aprobado por la Comisión Nacional de Investigación Científica del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) con el número 2010-785-002 y fue financiado por el Instituto de Ciencia y Tecnología del Distrito Federal (ICyT) a través del Fondo en Investigación en Salud (FIS) del IMSS (FIS/IMSS/PROT/714).
- Proyecto aprobado por la Comisión Nacional de Investigación Científica del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) con el número 127068 y fue financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT).
- Beca del proyecto no. 2009-785-104 a través del Fondo en Investigación en Salud (FIS) del IMSS (FIS/IMSS/PROT/703).

ABREVIATURAS

APC	Alofocianina
CARS	Síndrome de Respuesta Sistémica Compensatoria
cDC	Célula Dendrítica Convencional.
CMN SXXI	Centro Médico Nacional Siglo XXI
CMSP	Células Mononucleares de Sangre Periférica.
CPA	Célula Presentadora de Antígeno.
CSA	Célula Secretora de Anticuerpos
CTLA	Antígeno de Linfocito T Citotóxico
Cy	Cianina
EDTA	Acido etilendiaminotetraacético
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FLS	FACS Lysing Solution
HA	Hemaglutinina.
HLA	Antígeno Leucocitario Humano.
HMGB	Molécula de Alta Movilidad de la Caja del Grupo.
ICAM	Molécula de Adhesión Intercelular.
IFN	Interferón.
IFNR	Receptor de Interferón Tipo I
IL	Interleucina.
IMF	Intensidad Media de Fluorescencia
IP	Proteína Inducible por Interferón.
IRF	Factor Regulador de Interferón.
Mac	Antígeno de Macrófago.
MCP	Proteína Quimiotáctica de Monocitos.
MDA	Gen Asociado a la Diferenciación del Melanoma.
MHC	Complejo Principal de Histocompatibilidad.
MIG	Monocina Inducida por Interferón Gamma.
MIP	Proteína Inflamatoria de Macrófagos.
NA	Neuraminidasa.
NEP	Proteína de Exportación Nuclear.
NK	Célula Asesina Natural.
NLR	Receptor tipo Nod.
NLRP	NLR con Repeticiones Ricas en Leucina y Dominio Pirina.
NO	Oxido Nítrico.
NS	Proteína no Estructural.
PA	Polimerasa Ácida.
PAMP	Patrón Molecular Asociado a Patógeno.
PB	Polimerasa Básica.
pDC	Célula Dendrítica Plasmacitoide.
PE	Ficoeritrina
PKR	Proteína cinasa R.
PRR	Receptor de Conocimiento de Patrón.
RANTES	Quimiocina Regulada en la Activación, Expresada y Secretada por

	Linfocitos T.
RIG	Gen Inducible por Acido Retinoico.
RNA	Acido Ribonucleico
RNP	Ribonucleoproteína.
RT-PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa en Transcripción Reversa
SIRS	Síndrome de Respuesta Inflamatoria Sistémica.
Tc	Linfocito T Citotóxico.
TLR	Receptor tipo Toll.
TNF	Factor de Necrosis Tumoral.
TREM	Receptor Activador Expresado en Células Mieloides.
UIMIQ	Unidad de Investigación Médica en Inmunoquímica
USA	Estados Unidos de América
VIA	Virus de la Influenza A.

TABLA DE CONTENIDOS.

RESUMEN	2
MARCO TEÓRICO	3
1.1. Biología del virus de influenza A.	3
1.2. Mecanismo de infección.	5
1.3. Respuesta inmune innata frente al virus de influenza.	6
1.4. Respuesta inmune adquirida.	11
1.5. Epidemiología de la influenza.	13
1.6. La primera pandemia de influenza del siglo XXI.	14
1.6.1. Características clínicas y respuesta inmune.	15
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	17
JUSTIFICACIÓN	18
HIPÓTESIS	18
OBJETIVO GENERAL	19
OBJETIVOS PARTICULARES	19
MATERIALES Y MÉTODOS	20
RESULTADOS	26
DISCUSIÓN	37
CONCLUSIONES	44
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45

RESUMEN

A partir de abril del 2009, se registró en México una epidemia producida por una nueva cepa de virus de influenza humana pandémica A (H1N1) 2009. Este virus ha causado una enfermedad infecciosa de distribución pandémica y elevada transmisibilidad, que se caracteriza por un cuadro inflamatorio agudo y en ocasiones grave. Las características clínicas de esta nueva epidemia aún no se han descrito por completo y se desconocen en gran medida los aspectos moleculares del fenómeno inflamatorio agudo en los pacientes. En este trabajo caracterizamos el perfil inmunofenotípico de células mononucleares de sangre periférica (CMSP) de pacientes infectados con el virus de influenza pandémica A (H1N1) 2009 durante la respuesta inflamatoria aguda en el momento del periodo inicial de la pandemia actual. Esta caracterización consistió en la descripción de la distribución de las poblaciones de monocitos y linfocitos así como en la determinación de la expresión de los marcadores TREM-1, HLA-DR, CD69 y CD86 en las células de estos individuos. Los hallazgos indican que la distribución de las poblaciones de células TCD4⁺ y TCD8⁺ se encuentra disminuida respecto a voluntarios sanos. En estos pacientes, la proporción de linfocitos CD3⁻ se incrementa, mientras que la proporción de monocitos (CD14^{hi}) no presenta cambios significativos respecto a los sujetos sanos. El marcador de activación temprana CD69 muestra una disminución en su expresión relativa en linfocitos TCD8⁺; mientras que la expresión de la molécula co-estimuladora CD86 en linfocitos CD3⁻ se encuentra aumentada en pacientes con influenza pandémica respecto a voluntarios sanos. La expresión relativa del marcador pro-inflamatorio TREM-1 y de la molécula CD62L en monocitos no muestra diferencias significativas, mientras que la expresión de la molécula HLA-DR manifiesta un incremento en los pacientes con infección por virus de influenza pandémica, respecto a los voluntarios sanos. Las proporciones de las poblaciones celulares estudiadas así como la expresión de las moléculas analizadas no muestran diferencias significativas entre los pacientes con infección por virus de influenza pandémica A (H1N1) 2009 respecto a pacientes con infección respiratoria de etiología diferente al virus pandémico.

MARCO TEÓRICO

A lo largo de la historia, se han registrado diferentes pandemias ocasionadas por variantes de virus de la influenza A (VIA). La más letal ha sido la de 1918, llamada “Gripe Española”, que se atribuye al subtipo A H1N1 que provocó alrededor de 40 millones de muertes. En letalidad es seguida por las pandemias de 1957 en Asia y en 1968 en Hong Kong [1]. Más recientemente, en 1997 se describió una zoonosis conocida como gripe aviar, causada por la variante A H5N1 que ocasionó dos epidemias en Asia, la primera en el año 2004 y la segunda en el año 2008, donde la tasa de mortalidad alcanzó el 60% [2].

1.1. Biología del virus de influenza A.

Las infecciones por virus de influenza constituyen un grupo de enfermedades muy comunes y resultan altamente contagiosas con grados variables de mortalidad, que dependen tanto del tipo de virus como de características propias del huésped [3]. El virus de la influenza pertenece a la familia *Orthomyxoviridae* conociéndose 3 tipos básicos de virus, A, B y C. El virus de influenza A es el más importante de todos, ya que causa epidemias anuales y pandemias en intervalos irregulares. Existen muchos subtipos de virus que se clasifican en función a las diferencias antigénicas que se presentan entre sus proteínas de superficie, la hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (NA), las cuales se enumeran en función de las relaciones antigénicas que existen entre ellas. Hasta la fecha, se han descrito 16 tipos de HA y 9 tipos de NA [4].

La estructura general de los VIA es esférica o filamentosa. El virión proyecta espigas de hemaglutinina y neuraminidasa a través de una membrana proveniente de células huésped (que previamente infectó), que es atravesada discretamente por canales iónicos formados por la proteína M2. Esta envoltura y sus proteínas se encuentran sobre la proteína M1, la cual forma una matriz que encierra el núcleo del virión. Debajo de esta matriz, se encuentran la proteína de exportación nuclear (*Nuclear Export Protein*, NEP o NS2) y el complejo de ribonucleoproteína (RNP), el cual consiste en segmentos de RNA viral cubiertos con nucleoproteína (NP).

También se encuentra la RNA polimerasa heterotrimérica, la cual está compuesta por tres subunidades, una ácida (PA) y dos básicas (PB1 y PB2) [4].

El genoma del VIA está compuesto por ocho segmentos de RNA viral antisentido de cadena sencilla. Los segmentos 1, 3, 4 y 5 codifican exclusivamente para una sola proteína: PB2, PA, HA, y NP, respectivamente. En todos los virus de influenza, la proteína PB1 es codificada por el fragmento 2, sin embargo, en algunas cepas de influenza A, como en la H5N1 aviar, éste segmento también codifica para una proteína accesoria llamada PB1-F2, que tiene actividad pro-apoptótica, y que se genera por un marco de lectura alternativo en +1. El segmento 6 codifica para la proteína NA, el segmento 7 genera a la proteína de matriz M1, y por *splicing* alternativo, a la proteína de matriz M2. A partir del segmento 8, el VIA expresa la proteína antagonista de interferón tipo I, NS1, y por *splicing* alternativo del RNA mensajero, la proteína de exportación nuclear, que está involucrada en el transporte del complejo de ribonucleoproteína del núcleo de la célula huésped al citosol [4] .

Los extremos de cada segmento de RNA viral forman una horquilla helicoidal, el cual es unido por el complejo heterotrimérico de RNA polimerasa, el resto del segmento está cubierto con proteína nuclear rica en arginina. El fenómeno de deriva antigénica (*antigenic drift*) involucra ligeros cambios en la secuencia génica de las proteínas virales, especialmente en la HA, que provocan que los sitios de las determinantes antigénicas que eran reconocidos por los anticuerpos, se modifiquen y se evite este reconocimiento; este es el fundamento principal por el cual es necesario llevar a cabo campañas de vacunación anuales contra el virus estacional. El genoma segmentado del virus de influenza permite el cambio antigénico (*antigenic shift*), en el cual una cepa de virus de influenza A adquiere el segmento de HA, y probablemente el de NA, proveniente de otro virus de influenza de diferente subtipo. Esta recombinación puede ocurrir en células infectadas con diferentes cepas de virus, de origen animal y/o humano. El resultado puede ser un virus que codifica proteínas antigénicas completamente nuevas, contra las cuales no existe inmunidad previa; así es como surgen las pandemias de influenza. El

cambio antigénico genera nuevos virus para los cuales los humanos son susceptibles primordialmente por ser inmunológicamente vírgenes (no han interactuado previamente con el antígeno) a estos virus [5-11].

1.2. Mecanismo de infección.

El virus de influenza reconoce residuos de ácido siálico en la superficie de las células del huésped. El ácido siálico (ácido *N*-acetilneuramínico) es un monosacárido de nueve carbonos presente en muchos conjugados glicosilados, por lo que es ubicuo en muchas células y en muchas especies. El carbono 2 del ácido siálico se puede unir al carbono 3 o 6 de una galactosa, formando uniones α -2,3 ó α -2,6 glicosídicas, que resultan en configuraciones estéricas únicas. Estas uniones son reconocidas por las proyecciones de HA que tienen especificidad preferencial por residuos α -2,3 ó α -2,6. Las uniones α -2,6 son abundantes en las células epiteliales de la tráquea en humanos, mientras que las α -2,3 abundan más en el tejido respiratorio aviar [12]. La penetración del virus a la célula es mediada por la HA y se realiza a través de un endosoma. Una vez dentro, la liberación del virus depende de la acidez del endosoma donde, el bajo pH activa un cambio conformacional en la HA, que provoca la exposición del péptido que media la fusión de la envoltura del virus con la membrana del endosoma, formando un poro a través del cual las RNPs virales son liberadas hacia el citoplasma de la célula. Esta liberación está precedida por la acidificación interna del virus, que ocurre porque los protones del endosoma son transportadas al interior del virus por el canal iónico que forma la proteína M2. Esto modifica las interacciones entre proteínas, permitiendo la liberación de las RNPs virales de la matriz viral al citoplasma celular. El RNA y las proteínas responsables de la replicación entran al núcleo de la célula huésped donde llevan a cabo este proceso que culmina con la síntesis de las diferentes proteínas en los ribosomas. Posteriormente se produce el ensamblaje y la liberación de nuevos virus por gemación y lisis de las células infectadas. La NA hidroliza los residuos de ácido siálico presente en glicoconjugados celulares interviniendo en el proceso de liberación de las partículas virales y favoreciendo su diseminación [4].

1.3. Respuesta inmune innata frente al virus de influenza.

Como se mencionó anteriormente, el VIA debe fusionarse con la membrana celular, para poder entrar a la célula y secuestrar la maquinaria genética para poder llevar a cabo su replicación. Es aquí cuando el virus interactúa con las células de la respuesta inmune del hospedero. El sistema inmune innato es la primera línea de defensa que el virus activa cuando se encuentra dentro del hospedero. Cuando ésta se inicia, se secretan citocinas y quimiocinas como parte de la respuesta inmune inflamatoria, las cuales atraen a otras células, como neutrófilos, al sitio de la infección. Entre las citocinas que son inducidas, los interferones tipo I (IFN-I) representan el mecanismo de respuesta inmune innata más efectivo contra la replicación y propagación del VIA [13-14].

La respuesta inmune celular es estimulada por el reconocimiento de moléculas denominadas patrones moleculares asociados a patógenos (*Pathogen-associated molecular patterns*, PAMPs). Ejemplos de estos PAMPs presentes en el virus, pueden ser ácidos nucleicos virales, como RNA de cadena sencilla con grupos trifosfato en la posición 5' o RNA de cadena doble. Estos PAMPs son reconocidos por los receptores de reconocimiento de patrón (PRR, *Pattern Recognition Receptors*) de los cuales se han reportado tres grupos que juegan un papel importante para censar la infección por VIA [15].

El primer grupo corresponde a los receptores tipo Toll o TLR (*Toll Like Receptors*). Estos receptores poseen un dominio extracelular, con repeticiones ricas en leucina con función de reconocimiento de ligando, un dominio transmembranal y un dominio intracitoplásmico para la transducción de señales. Se han descrito 11 TLRs en el humano. De estos, los TLRs 3 y 7 se encuentran involucrados durante el reconocimiento del virus, las células dendríticas plasmacitoides (pDC) expresan diferencialmente TLR7, mientras que las dendríticas convencionales (cDC) expresan TLR3 [16-17]. El TLR3 reconoce RNA de doble cadena [18], mientras que los TLR7 y TLR8, reconocen secuencias de RNA de cadena sencilla ricas en uridina, como las que forman parte del genoma del VIA [19].

Las helicasas de RNA también son PRR que forman parte de otro sistema de reconocimiento del VIA, e incluyen al gen inducible por ácido retinoico-I (RIG-I) y al gen asociado a la diferenciación de melanoma 5 (MDA5) [15]. RIG-I es un receptor que participa directamente durante la infección por VIA [20]. La señalización a través de estos receptores deriva en la unión del factor de transcripción IRF-3 a su correspondiente sitio de unión en la región *enhancer* del gen de IFN- β e inicia la expresión del gen *ifn-b* posterior a la infección con VIA. El IFN- β secretado activa al receptor de interferón tipo I en la misma célula que lo secreta e induce la activación de IFN- α [16, 21].

El último grupo se compone por los receptores que integran a la familia de los NLR (*Nod-like receptors*) y se caracterizan por su capacidad de formar plataformas moleculares centrales, como lo inflamosomas, que permiten la activación de caspasas [15]. En especial, el complejo NLRP3 forma un inflamosoma activador de caspasa-1, la cual es capaz de procesar y activar a las pro-IL-1 β , pro-IL-18 y pro-IL-33, produciendo IL-1 β , IL-18 e IL-33 respectivamente, regulando así la respuesta inflamatoria [22]. De hecho, se demostró que la activación de caspasa-1 contribuye a la respuesta de linfocitos B y T en la infección contra VIA [23]. La secreción de interferones tipo I no sólo induce la transcripción de genes con actividad antiviral e inductores de apoptosis como la proteína cinasa R (PKR) o la 2'5' oligoadenilato sintetasa, sino que también activan a células dendríticas y otras células del sistema inmune, activando a la respuesta inmune adaptativa [16, 24-25].

La infección por el virus de influenza puede inducir en ocasiones una respuesta inflamatoria exacerbada que se relaciona con la severidad de la enfermedad y con la muerte de los pacientes infectados. La cepa viral H1N1 de la pandemia de 1918 fue altamente virulenta, así como lo fue la variante H5N1 responsable de un gran número de muertes en Asia entre los años 2004 y 2005 [1, 26-28].

La infección causada por el virus de influenza aviar H5N1 está caracterizada por un infiltrado muy importante de células en pulmón (neutrófilos, células dendríticas, linfocitos, monocitos), necrosis tisular, hemofagocitosis, aumento en la

concentración de citocinas pro-inflamatorias circulantes y daño en otros órganos como hígado y riñones [27-29]. En estos pacientes se encuentran niveles altos del virus en circulación a diferencia de la infección con otros virus que causan una sintomatología menos grave y en los cuales la carga viral únicamente es detectable en vías aéreas [30-31].

Esta respuesta inflamatoria exacerbada propuesta como “tormenta de citocinas”, se caracteriza por niveles elevados de IFN- α/β , IL-6, TNF- α , IL-8, MIP1- α/β , MCP-1 y RANTES principalmente dentro de pulmón [32]; fenómeno que se ha propuesto puede ser un factor contribuyente de los daños graves causados al órgano e inducidos por el virus. Pacientes con enfermedad aguda (duración menor a 36 horas), presentan una relación directa entre el aumento de IL-6 y TNF- α en sangre periférica y la gravedad del cuadro clínico [33]. También se ha reportado que cuando los niveles séricos de IP-10 y de MIG se mantienen elevados por más de cinco días, se asocian con un mal pronóstico [34]. Se ha descrito que los pacientes con carga viral alta en los pulmones generan una respuesta de citocinas elevada; no obstante, estos pacientes generalmente se recuperan [35], mientras que, los pacientes que presentan carga viral detectable también en sangre periférica, producen aun más citocinas como IP-10, MCP-1, IL-8, IL-6 e IL-10, evolucionan desfavorablemente e incluso fallecen [31]. Lo anterior sugiere que los mediadores de la respuesta inmunitaria durante la infección del virus de influenza aviar pueden ser cruciales tanto en el combate contra el virus como en los efectos patológicos de la infección.

Además de las citocinas mencionadas existen ciertos marcadores moleculares que podrían funcionar como herramientas importantes para el pronóstico de enfermedades; tal es el caso del receptor activador expresado en células mieloides-1 (TREM-1), la proteína cromosómica de la caja del grupo de Alta Movilidad (HMGB-1) [36-37] o el antígeno leucocitario humano (HLA) del complejo principal de histocompatibilidad (HLA-DR) [38], los cuales, entre otros, se han propuesto como marcadores predictivos en infecciones causadas por bacterias, virus y hongos; y en procesos inflamatorios sistémicos [39-41]. TREM-1 es un

receptor que pertenece a la superfamilia de las inmunoglobulinas y se encuentra en la membrana de neutrófilos y monocitos. Su expresión se incrementa en respuesta a la presencia de bacterias o sus productos; cabe destacar que en casos de psoriasis, colitis ulcerativa y vasculitis, que son patologías inflamatorias no infecciosas y localizadas, la expresión de TREM-1 no se incrementa [42], mientras que en procesos de inflamación sistémica como pancreatitis y estados postquirúrgicos TREM-1 se incrementa en la membrana de monocitos [39-40, 43]. Aunque inicialmente se propuso que la expresión de TREM-1 se asociaba a procesos inflamatorios con infección, se ha observado que en pacientes con pancreatitis, la expresión de TREM-1 se correlacionaba con inflamación pero no con infección. El ligando de TREM-1 se desconoce, pero a través de un anticuerpo agonista se puede activar TREM-1 e inducir la producción de citocinas y quimiocinas (TNF- α , IL-1 β , IL-8, MCP-1, MCP-3) [44]. La activación de TREM-1 también incrementa la expresión de moléculas de adhesión (ICAM-1, Mac-1 o CD11b/CD18), co-estimulación (CD86) y disminuye la producción de IL-10 [45]. El ligando de TREM-1 podría ser una molécula endógena liberada durante la necrosis asociada a daño celular, como el que se observa en los casos de sepsis, en donde está incrementada la forma soluble de TREM-1 [43]. TREM-1 sinergiza con diferentes ligandos de TLRs para producir mediadores inflamatorios y regular negativamente la producción de mediadores anti-inflamatorios [44]. Esto puede representar tal relevancia que en modelos de ratón, el bloqueo de la señalización por TREM-1 disminuye la magnitud de la inflamación y la mortalidad [46]. En ciertas situaciones, los mediadores inflamatorios se liberan y actúan sobre órganos remotos al sitio donde la inflamación se origina, lo que puede generar el desarrollo de manifestaciones clínicas que constituyen el Síndrome de Respuesta Inflamatoria Sistémica (SIRS, por sus siglas en inglés *Systemic Inflammatory Response Syndrome*) [47], acrónimo que se acuñó, para describir un conjunto de manifestaciones clínicas y de laboratorio, como resultado de una respuesta inflamatoria exacerbada.

Cuando la infección afecta a las vías respiratorias bajas, la magnitud y el carácter de la respuesta inflamatoria parecen estar reguladas por las citocinas y

quimiocinas que son inicialmente producidas por células epiteliales y posteriormente por leucocitos que han sido atraídos al epitelio [48]. Entre los leucocitos que son reclutados al sitio de infección, se encuentran los monocitos, su importancia radica en que esta estirpe celular puede ser reclutada hacia los sitios de inflamación donde sean requeridos para diferenciarse, a través de un mecanismo de rodamiento a nivel de las células endoteliales. En el sitio donde son requeridas, se diferencian en macrófagos o en células dendríticas dependiendo del microambiente de citocinas presente [49]. La molécula CD62L o L-selectina es una molécula de adhesión que juega un papel preponderante en este proceso de unión y rodamiento sobre las células endoteliales y, facilita su migración hacia los órganos linfoides secundarios o hacia los sitios donde se esté llevando a cabo un proceso inflamatorio [50]. En citología de la mucosa bronquio-alveolar, se observa un reclutamiento de células dendríticas y monocitos [51].

Se ha descrito que durante la infección por VIA las células dendríticas plasmacitoides (pDC) son las productoras profesionales de IFNs tipo I (IFN- α/β), por la rapidez en que lo hacen y por las grandes cantidades que llegan a producir en comparación con otras células [52]. La producción de IFN- α es crucial en la respuesta antiviral pero también es importante para la modulación de varios aspectos de la respuesta inmune como el incremento en la regulación de moléculas co-estimuladoras y moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC), activación de células NK, en la inducción de respuesta mediada por anticuerpos y la inducción de linfocitos T citotóxicos [53]. En el caso de las células dendríticas convencionales (cDC), éstas juegan un papel importante para llevar a cabo eficientemente el proceso de procesamiento y presentación de antígeno a linfocitos T, lo que las convierte en las células profesionales presentadoras de antígeno (APCs) por excelencia, grupo que incluye también a macrófagos y linfocitos B [54].

1.4. Respuesta inmune adquirida.

Los encargados de montar la respuesta inmune adquirida son los linfocitos T y B. Una vez que las células dendríticas procesan al antígeno, migran hacia los órganos linfoides secundarios donde presentan al antígeno en contexto de las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) de clase II a los linfocitos T CD4⁺, éstos se activan por las diversas señales que reciben, incluyendo la expresión de moléculas co-estimuladoras (como CD80, CD86) y la secreción de citocinas (IFN- γ , IL-4, IL-6, entre otras), y proceden a activar linfocitos B específicos al expresar CD40L, que promueve el cambio de isotipo, la maduración de la afinidad y la diferenciación a células productoras de anticuerpos o a células B de memoria [55-56]. Después de la activación de linfocitos T y B, se inducen distintos cambios dentro de las células, los cuales se reflejan en el exterior de las mismas y pueden ser utilizados como marcadores. Una molécula que se induce inmediatamente después de que ocurre activación celular en linfocitos y otras células es CD69, un receptor de la clase II de las lectinas tipo C, que se encuentra relacionado en el proceso de proliferación. Se ha observado que la expresión de la molécula CD69 en linfocitos T y B activados *in vitro* se manifiesta en un tiempo de 1-2 horas después de la estimulación inicial, lo que sugiere que este receptor está involucrado en la activación y/o la diferenciación [57]. Además a través de anticuerpos monoclonales contra este receptor, se estimula la producción de IL-2 que induce la proliferación de linfocitos T [58], la síntesis de TNF- α por éstos [59], y la secreción de óxido nítrico (NO) en monocitos [60]. En conjunto estos sucesos sugieren que CD69 puede actuar como un receptor pro-inflamatorio [61].

Entre las moléculas co-estimuladoras se encuentran CD80 y CD86. Estos receptores se expresan en las APCs y aumentan rápidamente su expresión debido a la presencia de señales inflamatorias y dependientes del antígeno, con el objetivo de optimizar la interacción de la APC con CD28 o CTLA-4 expresados en linfocitos T [62]. En el modelo del ratón de infección por virus de influenza se presenta un fenómeno no sistémico, localizado en los ganglios linfáticos

mediastinales donde se observa un incremento en la expresión relativa de CD69 y CD86 en linfocitos B que ocurre dentro de las primeras 24 a 48 horas después de la infección y que depende directamente de las señales mediadas por el receptor de interferón tipo I (IFN α) [14, 62].

Durante la fase inicial de la infección se puede observar leucopenia, a expensas de linfopenia [34]. La presencia de linfopenia en pacientes con fiebre y la disminución de la proporción de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ correlacionan con la severidad de la enfermedad y con la muerte [63]. En el caso particular de la infección por VIA, los linfocitos T CD8⁺ citotóxicos (Tc) juegan un papel primordial en la resolución de la infección, ya que se ha demostrado que la resolución de la infección corresponde a un incremento en la respuesta de linfocitos Tc, y que dicha respuesta puede detectarse en los pulmones del individuo infectado. Los linfocitos Tc reconocen complejos antigénicos de péptidos presentados en moléculas del complejo de histocompatibilidad de clase I (MHC I), expresados en células epiteliales infectadas. Estas células se destruyen por un mecanismo de exocitosis de gránulos ricos en perforinas y granzimas y por citotoxicidad dependiente de Fas-Fas Ligando [64-65]. Sin embargo, también se ha demostrado que la sola inducción de esta respuesta no es suficiente para la resolución completa de la enfermedad, ya que varios estudios clínicos y ensayos de laboratorios también han determinado que la respuesta inmunitaria mediada por anticuerpos es de gran importancia en la protección contra la reinfección del virus de influenza [66].

En humanos, los anticuerpos contra VIA se pueden observar tanto en suero como en las secreciones respiratorias, de 3 a 5 días después de la infección primaria. Se ha observado que la cinética de la respuesta de anticuerpos es consistente con la participación en la resolución de la enfermedad en el hospedero inmunocompetente [67-68]. Estos anticuerpos se encuentran sistémicamente en el suero, debido a las células secretoras de anticuerpos (CSA) en los ganglios linfáticos, las cuales son detectables en estos órganos a partir del día 4 a 5 después de la infección [69]. También pueden encontrarse localmente cuando el

virus es reconocido por las CPA de la submucosa de las vías aéreas, donde son detectables en tejido asociado a tracto respiratorio de 5-7 días después de la infección y alcanzan su pico entre los días 10 y 20. Se cree que estos anticuerpos pueden contribuir al control de la infección después de su transcitosis al espacio intersticial extravascular del tracto respiratorio por transporte activo a través de la membrana basal de las células epiteliales mediado por receptores poliméricos de inmunoglobulinas (pIgR) [70]. La protección se atribuye principalmente a los anticuerpos específicos para la hemaglutinina (HA). La inmunidad mediada por anticuerpos dirigidos contra la neuroaminidasa (NA) es más débil, y aunque no previene la infección, puede suprimir la replicación y por lo tanto reduce la morbilidad y la mortalidad [71-72].

1.5. Epidemiología de la influenza.

El impacto de la influenza ha sido reconocido desde hace siglos. Su estacionalidad en climas templados ha permitido hacer estimados de mortalidad y de morbilidad grave, como en el caso de hospitalización. La tasa de mortalidad más alta ocurre entre individuos de edad avanzada y en aquellos con enfermedades subyacentes. Las hospitalizaciones a causa de influenza se presentan en niños pequeños y mujeres embarazadas. La morbilidad es más difícil de identificar y la confirmación de laboratorio es necesaria para hacer estimados más precisos [73]. En las zonas templadas, la influenza es básicamente estacional. En el hemisferio norte, puede haber virus que sean identificados en otras temporadas del año, pero los brotes raramente se presentan antes de noviembre. Generalmente, los brotes dominados por el subtipo A (H3N2) comienzan tempranamente, el subtipo H1N1 se encuentra presente durante toda la temporada invernal mientras que el tipo B con frecuencia se presenta al término de la estación [74]. El tratamiento se basa en medidas de sostén, y consta de hidratación (oral y/o parenteral). El uso de antivirales específicos, como el oseltamivir y el zanamivir está indicado en casos confirmados de influenza [75-76]. Para prevenir la infección por el virus de influenza, el método de elección es la vacunación durante el periodo invernal cada año, ya que debido al fenómeno de

deriva genética, los virus de influenza mutan sus determinantes antigénicas lo que provoca que los anticuerpos producidos por el organismo hospedero sean ineficaces para combatir la infección causada por el virus mutado [77-78].

1.6. La primera pandemia de influenza del siglo XXI.

Un nuevo virus H1N1 de origen porcino emergió recientemente como la primera pandemia de influenza del nuevo siglo, sin embargo, su naturaleza y origen fueron inesperados. Este virus emergió de un virus porcino H1N1 adaptado a la transmisión humana sin que ocurriera un reacondicionamiento genético con los virus de influenza humana circulantes, lo que significa que los ocho segmentos génicos del virus animal se adaptaron a la transmisión humana [8-9].

En la fase inicial de la pandemia, el índice de mortalidad reportado en México fue de 2% [79]. Sin embargo, mientras el virus se esparcía globalmente, quedó claro que este virus H1N1 pandémico era de moderada gravedad y sus efectos no son comparables con lo que se vio durante la zoonosis causada por el virus H5N1 aviar o por la pandemia de 1918 [26]. No obstante, el virus pandémico H1N1 no se comporta como un virus estacional. La mortalidad reportada por la influenza estacional se centra en la población de edad avanzada principalmente [80], pero este comportamiento no ocurre con el nuevo virus A (H1N1) 2009; ya que la mayoría de las defunciones reportadas alrededor del mundo ocurrieron en individuos con un intervalo de edad entre 20 y 40 años [81-82].

El espectro clínico de la infección por el nuevo virus varía, incluyendo desde una enfermedad respiratoria moderada de las vías altas sin presencia de fiebre hasta el desarrollo de neumonía que puede facilitar la generación del Síndrome de Insuficiencia Respiratoria, asociada con graves daños a pulmón, la falla orgánica múltiple y la muerte. Esta última situación se observó en individuos jóvenes y sanos durante el periodo inicial de la pandemia [82-83].

1.6.1. Características clínicas y respuesta inmune.

El virus pandémico no posee ninguno de los factores de virulencia asociados con los virus H5N1 o H1N1 de 1918, por ejemplo: el residuo 627 de lisina o el 701 de asparagina en el gen PB2; el múltiple motivo de aminoácidos básicos en el péptido conector de la HA (HA₀); la serina 66 en el gen PB1-F2 o el residuo ácido glutámico 92 en el gen NS1 [84]. Sin embargo, en los modelos animales (en hurones, ratones y macacos) el virus causa una enfermedad más severa y posee una propensión mayor que el virus estacional H1N1, para infectar células epiteliales alveolares [85-87]. Estos animales fueron infectados con virus H1N1 pandémico o estacional, y se encontró que en el tracto respiratorio superior poseían títulos virales comparables pero la replicación viral en pulmones fue mayor en los animales infectados con el virus pandémico. Los pulmones de ratones infectados con el virus pandémico exponían un perfil marcado de inducción de citocinas (IL-4, IL-10, IFN- γ) [85]. Los pulmones de los macacos infectados contenían niveles mayores de quimiocinas MCP-1, MIP-1 α , IL-6 e IL-18 que los animales infectados con virus estacional [85]. Estos cambios pueden ser un reflejo de una replicación más extensa del virus pandémico en los pulmones en vez de tratarse de una posible propiedad intrínseca del virus de provocar una respuesta inmune aberrante en el hospedero [88].

Recientemente se han publicado dos estudios sobre la respuesta inmunitaria innata efectora ante el nuevo virus [89-90]. En el primero, en pacientes hospitalizados después de 5 días desde el inicio de los síntomas, se encontraron niveles elevados de diversas citocinas y quimiocinas; como IP-10, MCP-1, MIP-1 β , IFN- γ respecto a pacientes con infección leve, además de un grupo de mediadores involucrados en la polarización al fenotipo Th17 (IL-8, IL-9, IL-17, IL-6) y Th1 (TNF- α , IL-15, IL-12p70) los cuales únicamente fueron hallados en los pacientes hospitalizados [89]. En el otro trabajo, Osterlund, y colaboradores [90] estudiaron la activación de la respuesta inmune innata en células dendríticas (DCs) y macrófagos infectados con el nuevo virus pandémico A (H1N1) 2009 respecto a los virus estacionales. Se encontró que todos los virus inducían débilmente la

expresión de los genes de IFN- α/β , CXCL10, y TNF- α en DCs. Los interferones secretados lograron inhibir la replicación del virus pandémico. .

Poco se sabe aún acerca del nivel de inmunidad preexistente para el virus pandémico A (H1N1) 2009 en humanos, uno de los factores determinantes para la susceptibilidad al nuevo virus. Estudios preliminares sugieren que niños menores a 10 años pueden poseer baja o no preexistente inmunidad pero que los adultos mayores de 60 años podrían tener algún nivel de protección cruzada hacia la cepa pandémica [91]. Hancock y colaboradores analizaron la extensión de los anticuerpos con reactividad cruzada contra la cepa H1N1 2009 que estaban presentes en población pediátrica adulta, y adultos mayores como resultado de una infección previa por influenza o por vacunación reciente con vacunas estacionales con o sin adyuvantes. Esta vacunación indujo poca o nula respuesta de anticuerpos que cruzaran con el virus A (H1N1) 2009. Las personas menores de 30 años poseían poca evidencia de reactividad cruzada contra el virus. Sin embargo, una proporción de adultos mayores (34%) presentó anticuerpos preexistentes que mostraban una respuesta cruzada con el virus [92].

Hasta la fecha no se cuenta con suficiente evidencia sobre las respuestas de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ contra la infección por el virus pandémico. Únicamente se ha reportado la presencia de linfopenia en alrededor del 60% de los individuos infectados [83], específicamente de linfocitos cooperadores y citotóxicos [93].

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Durante el pasado mes de abril de 2009 se desencadenó una epidemia de influenza en México. El agente etiológico de la presente pandemia es un virus de reciente aparición que contiene genes de influenza humana, aviar y porcina que en un principio recibió el nombre de virus de la influenza humana A (H1N1) 2009. En nuestro país este virus ha causado una enfermedad infecciosa de distribución pandémica y elevada transmisibilidad caracterizada por un cuadro inflamatorio agudo y en ocasiones severo. Hasta la fecha, se registran más de 900 defunciones en nuestro país y alrededor del mundo suman más de medio millón de casos con al menos 13 mil defunciones. Aún no se conocen por completo los aspectos clínicos, celulares y moleculares del fenómeno inflamatorio agudo en los pacientes que padecieron esta enfermedad.

JUSTIFICACIÓN

El virus de influenza humana A (H1N1) 2009 ha producido la primera pandemia de influenza del siglo XXI. A partir de las pandemias pasadas, se conoce que este tipo de enfermedades presentan incrementos abruptos de morbilidad y mortalidad de forma estacional, que duran unas semanas y luego ceden para reaparecer meses después, en un lapso de uno a tres años. Todavía se desconocen por completo los aspectos clínicos, celulares y moleculares del fenómeno inflamatorio agudo en los pacientes infectados. Debido a lo anterior, es importante caracterizar celular y molecularmente este fenómeno inflamatorio. Este hecho permitirá establecer criterios que permitan mejorar la atención y proveer de un tratamiento oportuno a los pacientes.

HIPÓTESIS

Las poblaciones celulares de mononucleares de sangre periférica se encuentran disminuidas, mientras que la expresión de algunos marcadores de superficie de las mismas se incrementa en pacientes con infección por virus de influenza pandémica A (H1N1) 2009, con respecto a pacientes con infección respiratoria aguda diferente a la generada por el virus de la influenza pandémica y a voluntarios sanos.

OBJETIVO GENERAL

- Describir los cambios en la distribución de las poblaciones celulares y en la expresión de ciertas moléculas de superficie en células mononucleares de sangre periférica de sujetos infectados por el virus de influenza pandémica A (H1N1) 2009 respecto a pacientes con infección respiratoria de etiología diferente al virus de la influenza pandémica y voluntarios sanos durante el periodo de abril-mayo de 2009.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Describir la distribución de las poblaciones de células mononucleares de sangre periférica como monocitos y linfocitos en pacientes confirmados para infección por virus de influenza pandémica A (H1N1) 2009 respecto a pacientes con infección respiratoria de etiología diferente al virus de la influenza pandémica y voluntarios sanos.
2. Describir las diferencias en la expresión de CD69 y CD86 en linfocitos de pacientes confirmados con infección por virus de influenza pandémica A (H1N1) 2009 respecto a pacientes con infección respiratoria de etiología diferente al virus de la influenza pandémica y voluntarios sanos.
3. Describir las diferencias en la expresión de TREM-1, HLA-DR y CD62L en monocitos de pacientes confirmados con infección por virus de influenza pandémica A (H1N1) 2009 respecto a pacientes con infección respiratoria de etiología diferente al virus de la influenza pandémica y voluntarios sanos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño del estudio

Se realizó un estudio de casos y controles entre el grupo de pacientes con influenza A (H1N1) confirmada positiva, el grupo con pacientes con infección respiratoria de etiología diferente al virus pandémico y el grupo control de voluntarios sanos.

Universo de estudio

Pacientes que fueron ingresados al Servicio de Medicina Interna del Hospital de Especialidades “Dr. Bernardo Sepúlveda” del Centro Médico Nacional Siglo XXI del IMSS (CMN S.XXI) durante el periodo del 23 de abril al 17 de mayo de 2009, así como voluntarios sanos, que incluyeron estudiantes de medicina y personal diverso (capturistas y jubilados).

Criterios de Selección de sujetos

Los sujetos con infección respiratoria secundaria al virus de influenza A (H1N1) y los pacientes con infección respiratoria de etiología diferente al este virus [H1N1(+) y H1N1(-)] fueron diagnosticados e ingresados por el Servicio de Medicina Interna del Hospital de Especialidades del CMN S.XXI y seleccionados de acuerdo al resultado obtenido por la prueba rápida realizada *in situ*, así como por la prueba confirmatoria (Reacción en Cadena de la Polimerasa en Transcripción Reversa, RT-PCR) realizada por el Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (InDRE). Los sujetos control eran personas sin patología clínicamente evidente y fueron seleccionados al azar entre estudiantes de medicina y personal diverso (capturistas y jubilados). Todos los sujetos se sometieron a los siguientes criterios de selección.

Criterios de Inclusión

- Mayores de 18 años.
- Hombres y mujeres.
- Para el caso de pacientes:
 - Sospecha clínica de infección por virus de influenza por las siguientes características: inicio súbito del cuadro clínico durante los 7 días previos a su ingreso, con 2 o más de los siguientes síntomas: fiebre mayor a 39 °C, cefalea intensa, mialgias, odinofagia, rinorrea, astenia, insuficiencia respiratoria, náusea, vómito y/o diarrea.

Criterios de no Inclusión

- Sujetos que se rehúsen a participar en el estudio.

Criterios de Exclusión

- Coagulación o hemólisis de la muestra sanguínea.
- Sujetos cuyos datos se extravíen.

Sujetos de estudio

Los sujetos seleccionados para el presente estudio se distribuyeron en tres grupos. Grupos de estudio; pacientes con diagnóstico confirmatorio positivo de infección por virus de influenza pandémica A (H1N1) 2009 [H1N1(+)], pacientes con infección respiratoria de etiología diferente al virus pandémico [H1N1(-)], y Grupo control, sujetos clínicamente sanos.

Tamaño de la muestra:

Debido a que el presente estudio tiene como propósito estudiar el fenómeno inflamatorio agudo en pacientes afectados por un virus de reciente aparición, se determinó realizar el estudio con el número de pacientes que fueran hospitalizados con un diagnóstico probable de infección por virus de influenza dentro del periodo inicial de la epidemia, y que posteriormente fuera confirmado por RT-PCR, entre el 23 de abril y el 17 de mayo de 2009. Esta cantidad se equiparó con un número proporcional de voluntarios sanos para el grupo control.

Descripción de Variables

Variables de control:

- a) Diagnóstico de infección por virus de la influenza humana
- b) Días de estancia entre aparición de síntomas y toma de muestra.
- c) Evolución clínica.

Variables de estudio:

- a) Inmunofenotipo.

Variables demográficas:

- a) Edad.
- b) Sexo.

Definición operacional de las variables.

- Variables de control:
 1. Diagnóstico de infección por virus de la influenza humana. Se trata de una variable cualitativa nominal, que se expresa como diagnóstico definitivo o negativo.
 - Se consideró que el diagnóstico era definitivo cuando además del cuadro clínico descrito en los criterios de inclusión, se contaba con el resultado de la prueba confirmatoria (RT-PCR), ya fuera positiva o negativa.
 2. Días de estancia entre aparición de síntomas y toma de muestra. Es una variable cuantitativa continua que se expresa en días-calendario.
 3. Evolución clínica. Variable cualitativa ordinal que se define como mejoría, agravamiento o muerte.

- Variables de estudio:
 1. Inmunofenotipo: Variables cuantitativas continuas que se expresan como intensidad media de fluorescencia (IMF) o en porcentaje de células de la población total.
 - 1..1.1. Proporción de células CD14^{hi}, junto con su expresión de TREM-1, HLA-DR y CD62L.
 - 1..1.2. Proporción de células CD4⁺, CD8⁺ y CD3⁺ así como la expresión de las moléculas CD69 y CD86.
- Variables demográficas:
 1. Edad. Variable cuantitativa continua que se expresa en años-calendario.
 2. Sexo. Variable cuantitativa nominal que se expresa como femenino o masculino

Consideraciones éticas.

El presente estudio se apega a los estándares éticos internacionales establecidos en Helsinki y modificados en Tokio [94] y se desarrolló siguiendo los lineamientos de las Buenas Prácticas Clínicas [95].

PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

Inmunofenotipificación de células mononucleares de sangre periférica (CMSP).

De cada sujeto se obtuvieron 3.0 mL de sangre periférica por venopunción humeral con previa asepsia de la zona. La sangre se colectó en tubos estériles que contenían 1.8 mg de K₂EDTA por mililitro (etilendiaminotetraacetato de potasio) como anticoagulante.

Se colocó en una gradilla una serie de 3 tubos para citometría por cada muestra (sangre periférica) a analizar. Se rotularon los tubos de la siguiente manera: AF-n, T1-n Y T2-n. Donde "n"; correspondía a las iniciales del sujeto de estudio. Se adicionaron los anticuerpos correspondientes en cada tubo con la ayuda de micropipetas. Se agregaron 75 µL de sangre a cada tubo y se homogeneizaron con ayuda de la micropipeta. Se incubaron por 15 minutos a temperatura ambiente protegiendo a los tubos de la luz. Mientras, en otro tubo limpio, se realizó una dilución 1:10 de la solución FLS (FACS Lysing Solution, BD Biosciences, San Jose, CA, USA) 10x con agua destilada, y se adicionaron 250 µL a cada tubo. Se incubaron de nuevo exactamente por 10 minutos a temperatura ambiente, protegiendo de la luz. Posteriormente, se centrifugaron a 2500 rpm a 22 °C por 5 min. Se decantó el sobrenadante por inversión del tubo, en un frasco de desechos, golpeando ligeramente la parte inferior del tubo con ayuda del dedo índice, para retirar la mayor cantidad de sobrenadante. Se añadieron 100 µL de PBS y se resuspendió el botón perfectamente con ayuda de la pipeta. Los tubos se analizaron en el citómetro de flujo FACSAria (BD Biosciences, San Jose, CA, USA).

Los anticuerpos monoclonales marcados con distintos fluorocromos fueron utilizados para llevar a cabo una tinción de antígenos múltiples. El anti-CD14 marcado con ficoeritrina-cianina Cy5 (PE-Cy5) clona M5E2, IgG2a de ratón, κ; anti-HLA-DR marcado con alofococianina-cianina Cy7 (APC-Cy7) clona M5E2,

IgG2a de ratón, κ ; anti-CD3 marcado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) clona HIT3, IgG2a de ratón, κ ; anti-CD69 marcado con ficoeritrina (PE) clona FN50, IgG1 de ratón, κ ; anti-CD4 marcado con APC-Cy7 clona RPA-T4 IgG1 de ratón, κ ; y anti-CD86 marcado con PE-Cy5 clona 2331(FUN-1), IgG1 de ratón, fueron adquiridos de BD Biosciences Pharmingen (San Jose, CA, USA). El anticuerpo monoclonal anti-CD8 marcado con PE-Cy7 clona 3B5, IgG2a de ratón y anti-CD62L marcado con APC clona Dreg-56, IgG1 de ratón fueron obtenidos de Invitrogen (Invitrogen Co., Camarillo, CA, USA). El anticuerpo monoclonal anti-TREM-1 marcado con PE fue obtenido de R&D Systems (Minneapolis, MN, USA; clona 193015, IgG1 de ratón).

Análisis estadístico

Los datos obtenidos para las proporciones celulares y para la expresión de moléculas de superficie se muestran como el valor de la media con un intervalo de confianza del 95% o con el error estándar de la media, según sea el caso; y se evaluaron por medio de un análisis de varianza no paramétrico (prueba de Kruskal-Wallis) más una comparación múltiple *a posteriori* de Dunn entre todos los grupos. Se utilizó el programa GraphPad Prism versión 5.0, GraphPad Software (San Diego California, USA). El valor de $P < 0.05$ se consideró como significativo.

RESULTADOS

Sujetos analizados.

Se incluyeron un total 15 pacientes con pacientes con infección respiratoria de etiología probable por virus de influenza con un promedio de 5.1 ± 1.4 días entre la aparición del cuadro clínico y la toma de muestra, los cuales cumplieron con los criterios de inclusión; todos ellos se encontraban hospitalizados al momento de la toma de muestra y todos sobrevivieron a la infección. De estos pacientes, 9 resultaron positivos para la prueba confirmatoria por RT-PCR, y pasaron a formar parte del grupo H1N1(+); y 6 tuvieron un resultado negativo e integraron al grupo H1N1(-). Once individuos sanos accedieron a participar voluntariamente en el estudio firmando la carta de consentimiento informado. En la Tabla 1 se muestra los resultados demográficos de la población estudiada.

Tabla 1. Datos demográficos de pacientes con influenza y voluntarios sanos.

Grupo	H1N1(+)	H1N1(-)	Sanos
	[n=9]	[n=6]	[n=11]
Edad promedio en años (intervalo)	38.2 (19 – 78)	45.2 (29 – 49)	30.8 (22 – 64)
Sexo	Femenino/Masculino		
	4/5	2/4	7/4

Selección de las poblaciones de células mononucleares de sangre periférica por citometría de flujo.

Las poblaciones de células mononucleares de sangre periférica correspondientes a linfocitos y monocitos se analizaron a partir del gráfico de puntos obtenido para cada tubo.

Los linfocitos fueron seleccionados de la región correspondiente a su tamaño y granularidad, se identificaron las poblaciones de células CD3⁺ y CD3⁻. Los linfocitos CD3⁺ fueron clasificados en linfocitos T CD4⁺ o CD8⁺, dependiendo de la expresión de estos correceptores; a partir de esta fenotipificación, se analizó para cada sub-población, la expresión del marcador CD69. En el caso de la población de linfocitos CD3⁻, fue analizada la expresión de las moléculas CD69 y CD86 (Figura 1a).

Por tamaño y granularidad de un gráfico de puntos se seleccionó la región presuntiva para monocitos y se buscó la expresión diferencial de CD14. Para el análisis se toman como monocitos aquellas células que expresan CD14^{high} para excluir neutrófilos que expresan CD14^{low}. Después de esta selección, se analizó la expresión relativa de las moléculas de superficie TREM-1, HLA-DR y CD62L en monocitos CD14^{high} (Figura 1b).

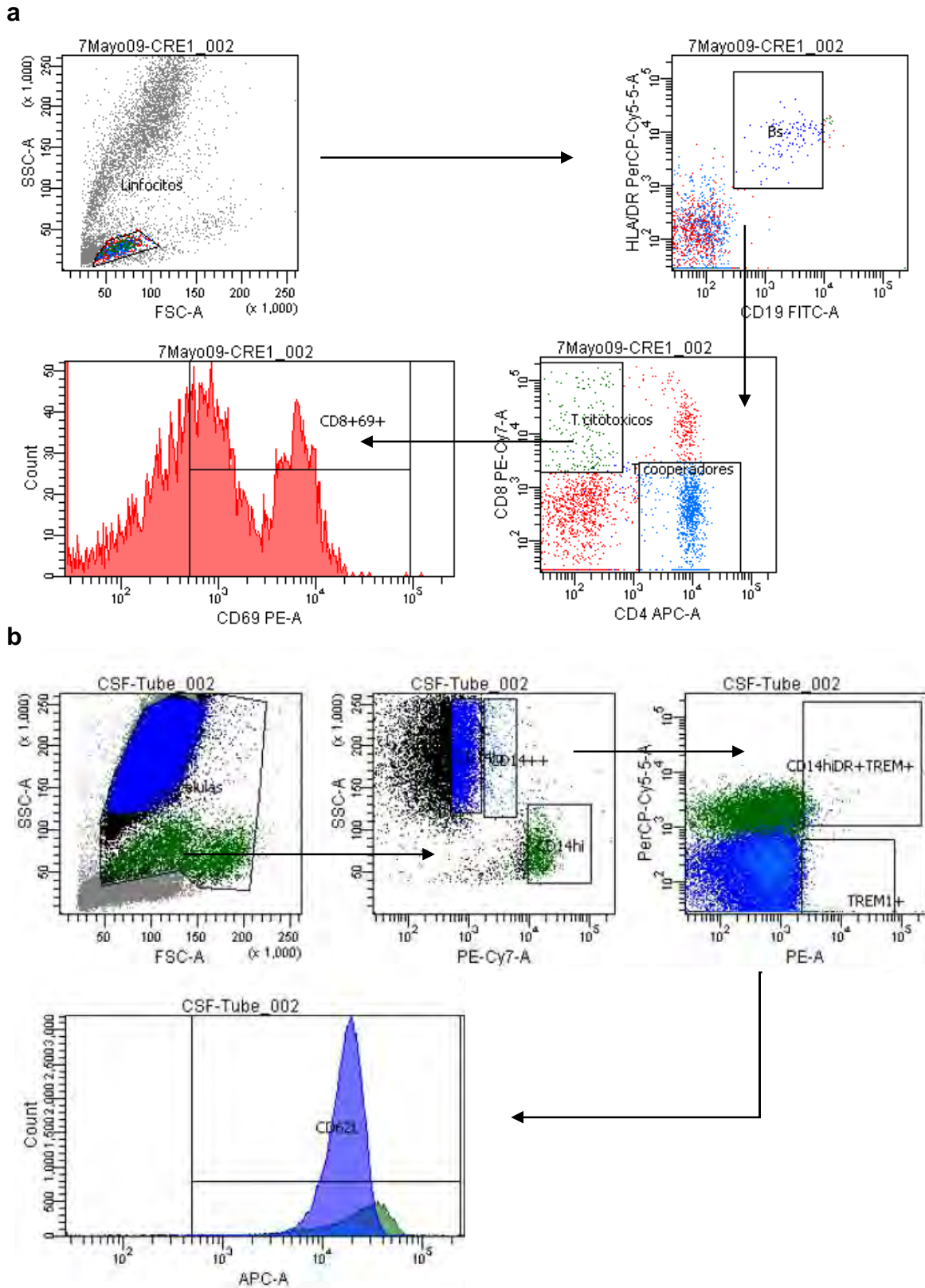


Figura 1. Selección de las poblaciones de células mononucleares de sangre periférica, a partir del análisis por citometría de flujo. Ejemplos de las plantillas utilizadas para el análisis de las poblaciones de CMSP. **[a]** Gráfico de puntos e histograma para las poblaciones de linfocitos. **[b]** Gráfico de puntos e histograma para monocitos CD14^{high}.

La proporción de las poblaciones de linfocitos CD3⁺ y CD3⁻ se invierten mientras que la población de monocitos no se modifica en CMSP de pacientes con influenza respecto a individuos sanos.

Se analizaron los cambios que ocurren en las poblaciones de linfocitos T, linfocitos B y monocitos de los pacientes y voluntarios sanos. Los resultados indican que la población de linfocitos T (CD3⁺) disminuye su cantidad de manera significativa ($P < 0.05$) en ambos grupos de pacientes con influenza respecto a los voluntarios sanos, fenómeno que se relaciona con la presencia de linfopenia. Sin embargo, no existen diferencias entre los mismos grupos de pacientes (valor medio de 20.2 ± 5.0 % para H1N1(+), 20.8 ± 7.8 % para H1N1(-) y 40.9 ± 9.5 % para sanos), (Figura 2a).

En el caso de los linfocitos CD3⁻, se observó un comportamiento contrario al manifestado en las poblaciones de linfocitos T del grupo de pacientes con prueba confirmatoria para influenza pandémica, es decir, la cantidad de linfocitos CD3⁻ mostró un incremento significativo ($P < 0.01$) entre este grupo (61.5 ± 14.9 %) y los voluntarios sanos (31.6 ± 7.0 %); sin embargo, dentro de los pacientes H1N1(-) no se incrementó significativamente (45.3 ± 11.3 %) respecto a algún grupo (Figura 2b).

Adicionalmente, se analizó la proporción de monocitos (células CD14^{hi}) en los distintos grupos de estudio. No se observó una diferencia significativa en la proporción de estas células en pacientes H1N1(+) respecto a los demás grupos; los valores de la media obtenidos fueron 12.6 ± 5.9 % para el grupo H1N1(+), 10.2 ± 2.1 % para pacientes H1N1(-) y 8.4 ± 0.9 % para los voluntarios sanos (Figura 2c).

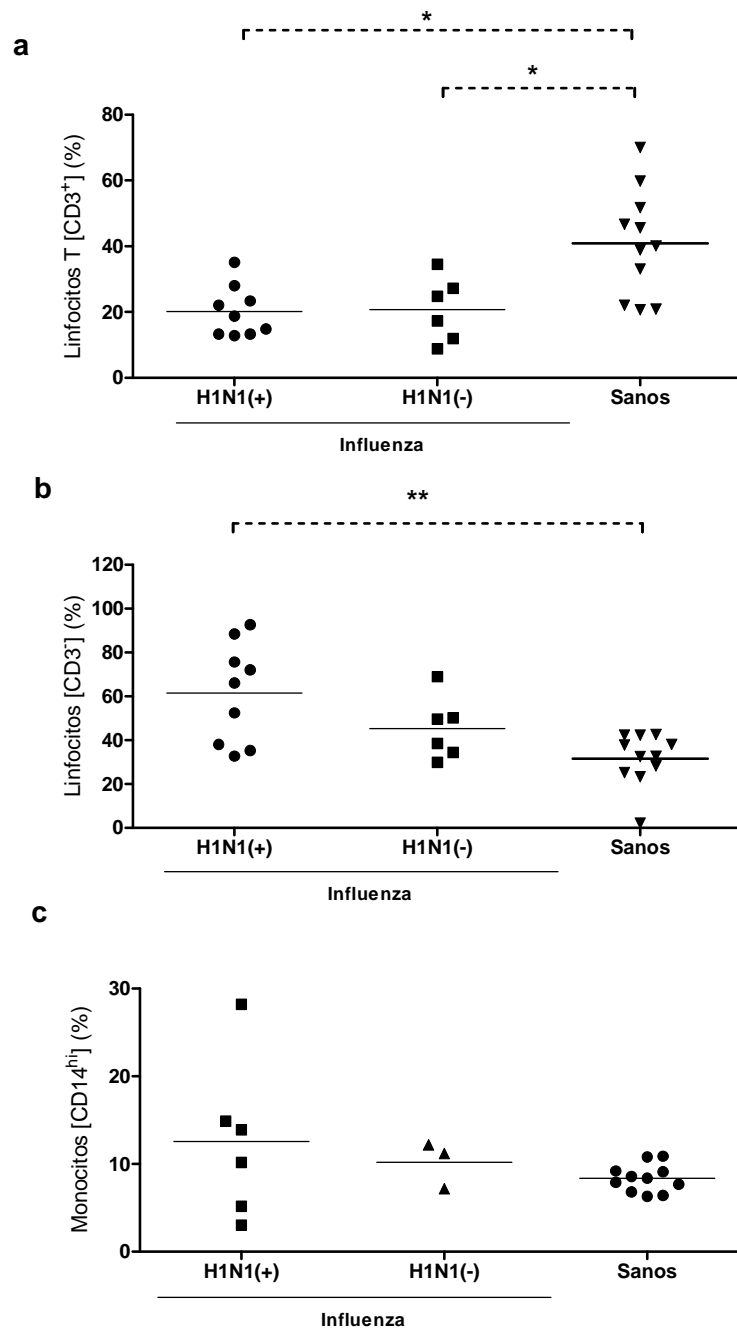


Figura 2. La proporción de las poblaciones de linfocitos T y B se invierten mientras que la población de monocitos no se modifica en células mononucleares de sangre periférica (CMSP) de pacientes con influenza. Se determinó la proporción de linfocitos T (CD3⁺) **[a]**, linfocitos B (CD3⁻) **[b]** y monocitos (CD14^{hi}) **[c]** en células mononucleares de sangre periférica (CMSP) de pacientes con diagnóstico confirmatorio, H1N1(+) y negativo, H1N1(-) para infección por virus de influenza pandémica A (H1N1) 2009 y de voluntarios sanos. Las barras representan los valores promedio y el error estándar. Prueba estadística de Kruskal-Wallis y comparación *a posteriori* de Dunn (** $P < 0.01$).

Las poblaciones de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ disminuyen en pacientes con influenza respecto a voluntarios sanos.

A partir de la observación de linfopenia en la población de células T, se analizaron las sub-poblaciones de linfocitos T (CD4⁺ y CD8⁺) con el fin de indagar si la linfopenia era general o propia de alguna de las sub-poblaciones. Los resultados obtenidos muestran que hay una disminución significativa en el porcentaje de ambas sub-poblaciones de linfocitos T entre los grupos de pacientes con influenza pandémica A (H1N1) 2009 con respecto a los voluntarios sanos, a los cuales les corresponden los valores medios de $14.0 \pm 5.6 \%$ y $61.4 \pm 5.5 \%$ respectivamente en el caso de linfocitos T CD4⁺ ($P < 0.001$); para los linfocitos T CD8⁺ fueron de $12.7 \pm 5.5\%$ [H1N1(+)] y $37.8 \pm 5.4 \%$ (sanos). En el caso del grupo H1N1(-) se observó diferencia significativa dentro de la sub-población de linfocitos T CD4⁺ respecto a voluntarios sanos, cuyo valor fue de $23.0 \pm 11.1 \%$ ($P < 0.05$), sin embargo, no hubo diferencia entre los grupos de pacientes con influenza (Figuras 3a, b).

Cao y colaboradores han reportado que un índice de linfocitos CD4:CD8 inferior a 1.4 es propio de linfopenia en pacientes infectados con virus de influenza pandémica A (H1N1) 2009 [93]. En base a este antecedente, realizamos el cálculo de este índice y los resultados fueron de 0.8 ± 0.3 para los pacientes H1N1(+), 1.0 ± 0.5 para los H1N1(-) y 1.9 ± 0.8 para los voluntarios sanos; se observó diferencia significativa únicamente entre los grupos H1N1(+) y los sujetos sanos ($P < 0.05$), el valor del índice comparado entre los pacientes H1N1(+) y H1N1(-) no fue diferente (Figura 3c).

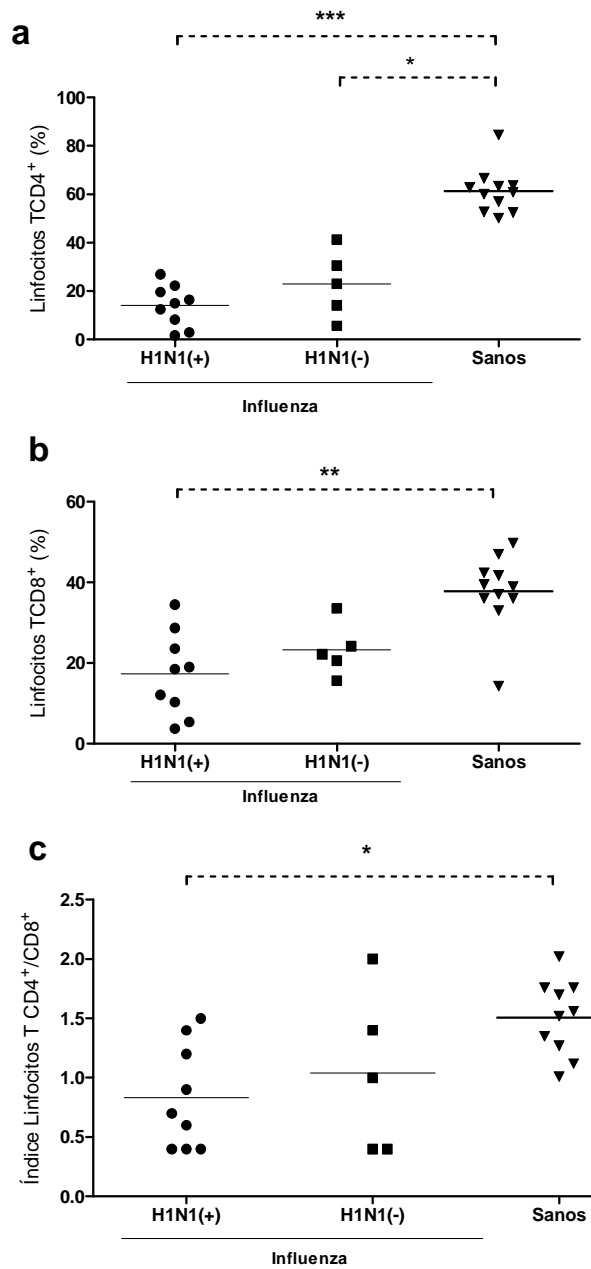


Figura 3. Las poblaciones de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ disminuyen en pacientes con influenza. Se determinó la proporción de linfocitos TCD4⁺ y TCD8⁺ en células mononucleares de sangre periférica (CMSP) de pacientes con diagnóstico confirmatorio positivo, H1N1(+) y negativo H1N1(-) para infección por virus de influenza pandémica A (H1N1) 2009 y de voluntarios sanos [a, b]. Además se calculó el índice de linfocitos CD4:CD8 para los mismos grupos [c]. Las barras representan los valores promedio y el error estándar. Prueba estadística de Kruskal-Wallis y comparación *a posteriori* de Dunn (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$).

La expresión relativa de la molécula de activación temprana CD69 en las poblaciones de linfocitos T de pacientes con influenza respecto a voluntarios sanos.

Para conocer el estado de activación que guardaban los linfocitos T se estudió la expresión relativa de la molécula CD69 en células TCD4⁺ y TCD8⁺. El comportamiento observado en la expresión en los linfocitos TCD4⁺CD69⁺ no mostró diferencias significativas entre ninguno de los grupos de estudio (sus valores medios fueron 31.2 ± 7.3 % para H1N1(+), 32.1 ± 11.3 % para H1N1(-) y 40.3 ± 16.7 % para sujetos sanos (Figura 4a).

En lo que respecta a los linfocitos TCD8⁺, se observó de manera clara y significativa que la expresión de CD69 disminuía entre ambos grupos de pacientes con influenza [H1N1(+), 22.8 ± 11.3 % y H1N1(-), 26.0 ± 10.5 %] respecto a los voluntarios sanos (81.7 ± 15.1 %) ($P < 0.001$ para H1N1(+) y $P < 0.05$ para H1N1(-)), respectivamente), sin embargo, entre los mismos grupos de pacientes, no se observó diferencia significativa (Figura 4b).

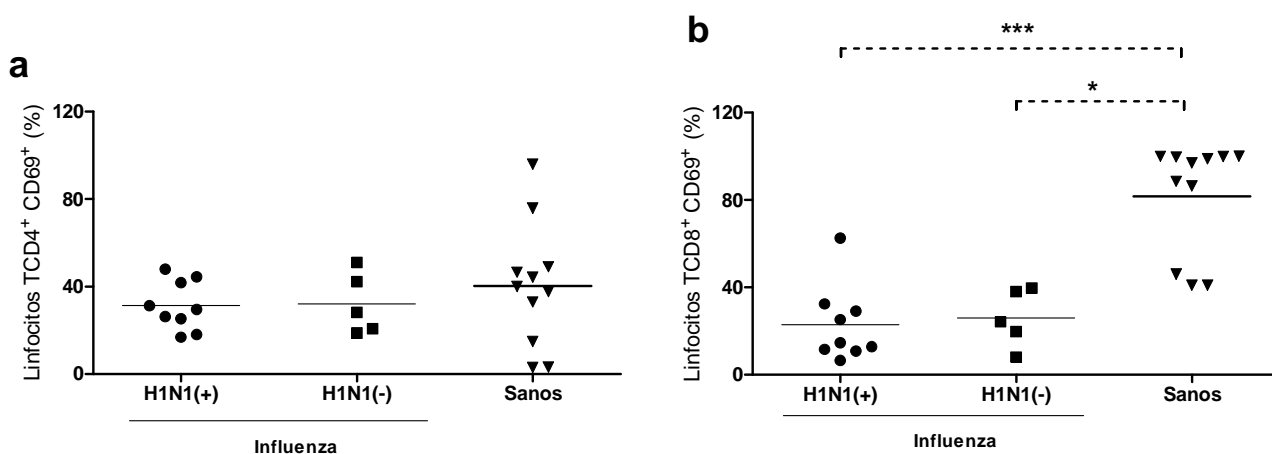


Figura 4. La expresión relativa de la molécula de activación temprana CD69 disminuye en las poblaciones de linfocitos T de pacientes con influenza. Se determinó la proporción de linfocitos TCD4⁺ y TCD8⁺ que expresaban la molécula CD69 en células mononucleares de sangre periférica (CMSP) de pacientes con diagnóstico confirmatorio positivo, H1N1(+) y negativo H1N1(-) para infección por virus de influenza pandémica A (H1N1) 2009 y de voluntarios sanos [a, b]. Las barras representan los valores promedio y el error estándar. Prueba estadística de Kruskal-Wallis y comparación *a posteriori* de Dunn (* $P < 0.05$, *** $P < 0.001$).

El porcentaje de linfocitos CD3⁺ que expresan la molécula CD69 no se modifica, mientras que la expresión de CD86 se incrementa en pacientes con influenza respecto a individuos sanos.

Se realizó un análisis similar al llevado a cabo en células T para la población de linfocitos CD3⁺ que expresaban la molécula CD69 (CD3⁺CD69⁺); se observó un comportamiento similar al mostrado por los linfocitos TCD4⁺, es decir, no hubo diferencia significativa entre alguno de los grupos de estudio; los valores obtenidos fueron 31.0± 11.5 % en H1N1(+); 39.8 ± 11.3 % para H1N1(-) y 25.4 ± 8.1 % para el caso de los sanos (Figura 5a).

Dentro de la población de linfocitos CD3⁺ se estudió la expresión relativa de la molécula de co-estimulación CD86. Los resultados muestran que la intensidad media de fluorescencia (IMF) para la expresión relativa de CD86, se incrementaba significativamente en ambos grupos de pacientes enfermos respecto a los voluntarios sanos, aunque no hay diferencias entre los mismos grupos de pacientes enfermos ($P < 0.001$ y $P < 0.01$). Los valores de la media obtenidos fueron 2634.0 ± 649.4 para H1N1(+), 2227.8 ± 398.8 para H1N1(-) y 686.8 ± 208.5 para los voluntarios sanos (Figura 5b).

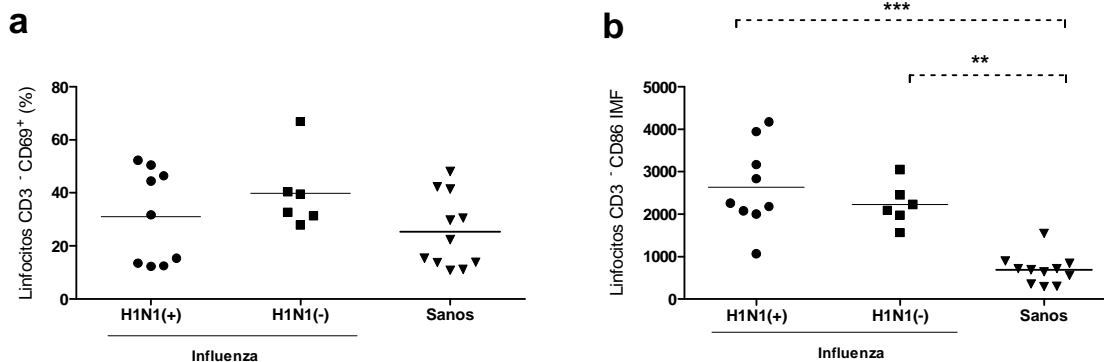


Figura 5. El porcentaje de linfocitos CD3⁺ que expresan la molécula CD69 no se modifica, mientras que la expresión de CD86 se incrementa en de pacientes con influenza. Se determinó la proporción de linfocitos CD3⁺ que expresaban CD69 en células mononucleares de sangre periférica (CMSP) de pacientes con diagnóstico confirmatorio positivo H1N1(+) y negativo H1N1(-) para infección por virus de influenza pandémica A (H1N1) 2009, así como de voluntarios sanos [a]. También se estudió la expresión relativa de la molécula CD86 en linfocitos CD3⁺ [b]. IMF = Intensidad Media de Fluorescencia. Las barras representan los valores promedio y el error estándar. Prueba estadística de Kruskal-Wallis y comparación a posteriori de Dunn (** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$)

La expresión de moléculas de superficie involucradas en la respuesta inflamatoria (HLA-DR, TREM-1 y CD62L) en monocitos de pacientes con influenza es variable.

Se estudió la expresión de moléculas en la superficie de monocitos (CD14^{hi}) en los sujetos de estudio. Los resultados obtenidos fueron heterogéneos; en el caso de la expresión de TREM-1, ésta se reportó como intensidad media de fluorescencia (IMF) de acuerdo a lo referido en la literatura [39-40], el resultado obtenido no mostró la presencia de alguna diferencia significativa en la expresión relativa de la molécula entre alguno de los grupos de estudio respecto a sujetos sanos; sus valores de IMF fueron: 3108.2 ± 728.8 para H1N1(+), 1329.8 ± 1064.0 y 3456.4 ± 1678.7 (sanos) (figura 6a).

Los monocitos de pacientes con resultado confirmatorio para A H1N1 2009 expresan la molécula HLA-DR (CD14^{hi}HLA-DR⁺) en una proporción significativamente mayor que la expresión en voluntarios sanos. No obstante, no se presenta esta diferencia entre el grupo H1N1(-) y el grupo de sanos ni se observa tampoco entre los dos grupos de pacientes enfermos. Los valores obtenidos fueron 95.4 ± 1.7 % para H1N1(+), 95.8 ± 2.3 % para H1N1(-) y 51.7 ± 18.2 % (sanos) (Figura 6b).

Finalmente, se analizó la expresión relativa de CD62L en monocitos, sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre alguno de los distintos grupos de estudio; los valores de la intensidad media de fluorescencia (IMF) fueron: 6683.0 ± 3537.0 para H1N1(+), 6480.3 ± 3869.5 (H1N1-) y 5824.3 ± 1688.2 (sanos) (Figura 6c).

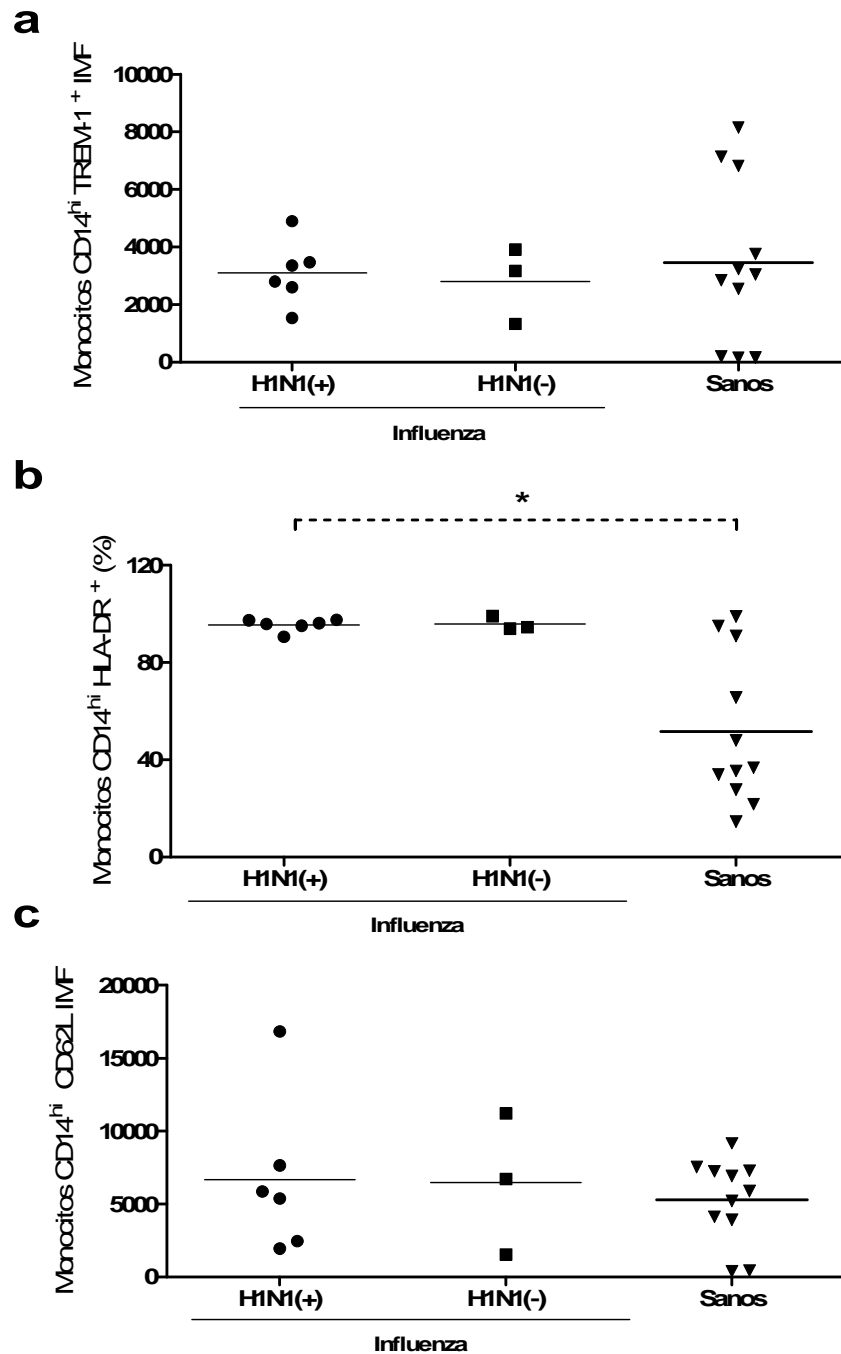


Figura 6. La expresión de moléculas de superficie involucradas en la respuesta inflamatoria (HLA-DR, TREM-1 y CD62L) en monocitos de pacientes con influenza es variable. Se determinó la expresión relativa de los moléculas de superficie TREM-1 [a], HLA-DR [b] y CD62L [c] en monocitos (CD14^{hi}) de pacientes con diagnóstico confirmatorio positivo H1N1(+) y negativo H1N1(-) para infección por virus de influenza pandémica A (H1N1) 2009, así como de voluntarios sanos. IMF = Intensidad Media de Fluorescencia. Las barras representan los valores promedio y el error estándar. Prueba estadística de Kruskal-Wallis y comparación a posteriori de Dunn (* $P < 0.05$).

DISCUSIÓN

La influenza es una infección contagiosa de origen viral considerada una de las causas más importantes de infecciones de las vías respiratorias. El virus de la influenza A se caracteriza por causar una enfermedad que va de moderada a grave; y cuando ocurren variaciones antigénicas mayores se forman nuevos subtipos de influenza ante las cuales no existe inmunidad previa en la población y son las que se asocian a pandemias tal como la que acontece en la actualidad, causada por el virus pandémico A (H1N1) 2009.

Cuando se emitió la alerta sanitaria el 17 de abril, se esparció en la población un estado de pánico, y cualquier enfermedad respiratoria parecida a influenza era motivo para acudir a recibir atención médica, lo que provocó la saturación de los servicios de salud. Los pacientes con sospecha de enfermedad respiratoria semejante a influenza eran ingresados, y la toma de muestra se enfocaba principalmente al diagnóstico confirmatorio de la infección a partir de un exudado faríngeo. No obstante, el desconocimiento de la virulencia y del peligro de este nuevo virus provocó preocupación dentro los médicos encargados de la toma de muestra, de tal manera que reunir el número de muestras planeadas fue una labor ardua y compleja de lograr. Sin embargo, se logró el acceso a individuos infectados y se les tomó una muestra sanguínea para analizar la respuesta inmune que estaban montando contra la infección por el nuevo virus. Así, se procedió al análisis de las muestras obtenidas de pacientes ingresados al Hospital durante el periodo inicial de la pandemia actual. Tomando en cuenta que nuestro país, fue la principal nación afectada durante el inicio de la pandemia, era imperativo generar rápidamente un conocimiento sobre la respuesta inflamatoria provocada por la infección viral; este fue el objetivo primordial de nuestro grupo de investigación.

Los resultados obtenidos revelan la presencia una disminución generalizada de las poblaciones de células T, específicamente en las sub-poblaciones TCD4⁺ y TCD8⁺. Se tiene documentado que una característica importante en la mayor parte de los casos de pacientes infectados por el virus de influenza A, es la presencia de

linfopenia transitoria [83, 93, 96]. Este fenómeno se ha observado con mayor frecuencia durante la infección producida por el virus H5N1 de influenza aviar, donde la linfopenia en presencia de fiebre se ha asociado a un pronóstico desfavorable [63]; sin embargo, estas variaciones transitorias son similares a las observadas en los casos de influenza estacional. Recientemente, entre los primeros reportes surgidos acerca de las características clínicas de la infección por el nuevo virus de influenza pandémica A (H1N1) 2009, la linfopenia se encontraba dentro del cuadro clínico en aproximadamente el 60% de los pacientes [83, 93, 97], la cual se mantiene alrededor de 3 a 6 días después de la aparición de los primeros síntomas [93]. En el caso de los pacientes que participaron en nuestro estudio, el número de días comprendidos entre el inicio del cuadro, hasta la toma de muestra fue de 5.1 ± 1.4 días, valor que correlaciona con lo reportado en la literatura y que resulta crucial para comprender el estado que guardaban las diferentes poblaciones de CMSP al momento de analizarlas.

Hasta la fecha no se ha logrado identificar con certeza el conjunto de causas que provocan la aparición de la linfopenia transitoria durante la infección por virus de influenza. Algunos reportes muestran que los virus de influenza A y B inducen apoptosis en una variedad de tipos celulares *in vitro* e *in vivo* (por ejemplo, en macrófagos o en la línea celular de linfocitos aviares RP9 [98-100]). Se piensa que la apoptosis forma parte del mecanismo de defensa por parte del hospedero ante la infección y que la señalización por la interacción de Fas-FasL juega un papel preponderante dentro de los mecanismos que regulan la población de linfocitos, ya que la unión de Fas con su ligando, generalmente expresado en linfocitos T citotóxicos, induce apoptosis en las células infectadas [101]; se cree que este mecanismo limita la replicación viral, aunque también se ha reportado que el virus de influenza supera este obstáculo multiplicándose rápidamente antes de que se induzca la apoptosis [102]. Sin embargo, existe evidencia de que la inducción de apoptosis es esencial para la replicación y la propagación del virus [103], además que la síntesis eficiente de mRNA viral también se ha tratado de correlacionar con la inducción de apoptosis [104].

El aumento observado en la proporción de linfocitos CD3⁺ podría ser un simple efecto numérico producido por la disminución en la proporción de células T analizadas y no necesariamente que esté ocurriendo un fenómeno de linfopoyesis. Sin embargo, dentro de la población de linfocitos CD3⁺ se encuentran a las células NK [105] y los linfocitos B; y aunque se ha reportado que el virus de influenza provoca también la apoptosis de las NK [106], nosotros observamos que en conjunto con los linfocitos B se incrementaban. No obstante, recientemente se publicó un trabajo donde se analiza el efecto de la infección del nuevo virus de influenza sobre células del sistema inmune, lo que observa en linfocitos B es una disminución en la cuenta de células en pacientes con influenza pandémica y pacientes sospechosos de influenza, tal y como se tiene reportado en la literatura. Sin embargo, el número de linfocitos B comienza a incrementarse 48 horas después de la primera toma de muestra lo que los autores sugieren como un signo de mejoría [97].

Debido a que las proporciones de células TCD4⁺ y TCD8⁺ se observaron disminuidas entre los pacientes con influenza respecto a los sanos, se esperaría que mostraran un comportamiento semejante en cuanto a su estado de activación durante el curso de la infección. Una molécula de superficie que es inducida justo después de la activación de linfocitos T y B es CD69, un receptor que se encuentra relacionado dentro del proceso de proliferación [61]. Se ha observado que la expresión de la molécula CD69 en linfocitos T y B activados *in vitro* se manifiesta en un tiempo de 1 a 2 horas después de la estimulación inicial, lo que sugiere que este receptor está involucrado en mejorar la activación [57], además se ha reportado que al utilizar anticuerpos monoclonales contra el receptor, se estimula la producción de IL-2 que induce un aumento en la proliferación de linfocitos T [58]. El hecho de que la expresión de CD69 en linfocitos TCD4⁺ en sangre periférica fuera constante en todos los grupos de estudio no significa que estos linfocitos no estén ejerciendo sus funciones dentro de la respuesta inmune adquirida que se monta contra el virus, sino que no están siendo activados a tal grado que pueda ser observados a nivel sistémico. La muestra de sangre periférica que se está analizando, solamente nos refleja la gravedad del fenómeno

inflamatorio que está ocurriendo sistémicamente más no en el tracto respiratorio; hallazgos más reveladores podrían encontrarse en el sitio de infección activa, como en los alveolos o en los ganglios linfáticos cercanos a este sitio; donde sería más probable encontrar linfocitos T cooperadores activados que expresarían diferencialmente a CD69 entre sujetos sanos y enfermos [62]. En lo que respecta a la respuesta de linfocitos TCD8⁺, el hecho de que disminuyera la proporción de estas células, así como el porcentaje de éstas que expresan CD69 en los pacientes con influenza respecto a sanos, podría estar relacionado con el papel primordial de los linfocitos T citotóxicos como efectores que estarían participando directamente en el sitio de infección ejerciendo su actividad citolítica en células infectadas, por lo que estarían infiltrándose dentro del tejido respiratorio lo cual disminuiría su cantidad en circulación; el hecho que la expresión de CD69 esté por debajo de los controles sanos, puede deberse a que [65].

Entre las moléculas co-estimuladoras fundamentales se encuentran CD80 y CD86. Estos receptores se expresan en las APCs y su número en la superficie aumenta rápidamente debido a la presencia de señales causadas directamente por el antígeno o por señales inflamatorias que permiten mejorar la interacción con CD28 o CTLA-4 expresados en linfocitos T [62]. El aumento en la expresión de CD86, puede deberse en particular a la secreción ciertas citocinas, como interferones tipo I (IFN- α/β) entre otros, los cuales ejercen un papel importante en promover el estado antiviral [16]; estas afirmaciones parten de la observación que en el modelo de ratón de infección por virus de influenza se presenta un fenómeno no sistémico, localizado en los ganglios linfáticos mediastinales donde se observa un incremento en la expresión relativa de CD69 y CD86 en linfocitos B que ocurre dentro de las primeras 24 a 48 horas después de la infección y que depende directamente de las señales mediadas por el receptor de interferón tipo I (IFNR) [62].

Giamarellos-Bourboulis y colaboradores, han reportado que la población de monocitos se incrementa en pacientes con influenza pandémica A (H1N1) en comparación a los sujetos sanos [97]. Este resultado no se observó en nuestro

universo de estudio. Los días transcurridos en el caso de la infección de los pacientes (5.1 ± 1.4 días), pudieron haber sido suficientes para permitir que la mayoría de los monocitos circulantes que se podrían encontrar incrementados al inicio, hayan sido reclutados hacia los sitios de infección para continuar con su diferenciación hacia macrófagos o células dendríticas en los tejidos [49, 107], por lo que no se lograría observar en circulación periférica una diferencia en la población de estas células.

La expresión de TREM-1, receptor involucrado directamente en la potenciación de la respuesta inflamatoria en monocitos no se modifica en nuestros pacientes, lo cual implicaría que este receptor no está potenciando la producción de mediadores inflamatorios.. Sin embargo, el tiempo al cual se alcanza la máxima expresión del marcador en monocitos debe ser en la fase temprana de la respuesta inflamatoria aguda, la cual alrededor del día 5 post-inicio puede considerarse como la fase tardía de la misma y no se esperaría encontrar células mieloides expresando este marcador, al menos no en sangre periférica. No obstante, dado que la expresión de la molécula en monocitos no se observa al día 5, no hay que olvidar que TREM-1 posee una forma soluble (sTREM-1), el cual ya ha sido reportado como biomarcador para el diagnóstico de neumonía [108] y podría tomarse en consideración.

La disminución en la expresión relativa de HLA-DR es un fenómeno que se observa en pacientes con CARS (*Compensatory Anti-inflammatory Response Syndrome*, o Síndrome de Respuesta Sistémica Compensatoria). En varias ocasiones se ha tratado de utilizar al HLA-DR como un marcador pronóstico de la evolución de los pacientes, sin embargo, los resultados no han sido tan alentadores concluyentes [109]. Los pacientes con influenza de nuestro estudio incrementaron la expresión de este marcador en sus monocitos, sin embargo, ninguno de ellos falleció.

La molécula CD62L o L-selectina es una molécula de adhesión que juega un papel importante en el proceso de unión y sucesivo rodamiento de los leucocitos sobre las células endoteliales, facilitando su migración hacia sitios de inflamación

[110]; la expresión relativa de la L-selectina indica que los monocitos que se encuentran en circulación hasta el día 5 en promedio post-inicio de síntomas, ya no estarían contribuyendo adicionalmente al fenómeno inflamatorio local (en pulmón) por lo que no sería necesario reclutar más monocitos a este sitio.

Considerando que la toma de muestra se realizó en promedio 5 días después del inicio de síntomas, nuestros resultados sugieren que tanto el aumento en la expresión relativa de HLA-DR como el hecho de que no se observaron modificaciones en la expresión relativa de TREM-1 y CD62L en monocitos, podrían estar asociados con buen pronóstico ya que ninguno de los pacientes falleció. No obstante, un aspecto que debería analizarse también, es la determinación de estos biomarcadores en la zona de infección para analizar su posible presencia así como la expresión de los mismos en las distintas células que se infiltran por el análisis de lavados bronquioalveolares.

En resumen, el hecho de que exista una linfopenia de células T en general aunando a que la activación de los linfocitos T citotóxicos se encuentre disminuida puede influir terminantemente en que la infección sea resuelta exitosamente. También no se debe pasar por alto la función que realizan las células NK auxiliando en la eliminación de células infectadas que no expresan moléculas de MHC clase I en las que ha reportado también la inducción de apoptosis causada por el virus [111]. Se debe estar consciente que existen otros mecanismos para combatir la infección que se están llevando a cabo simultáneamente, por ejemplo, la secreción de quimiocinas y citocinas pro-inflamatorias en el tejido dañado. Entre estos mediadores solubles, se encuentran algunos de carácter antiviral, como los interferones tipo I, que están jugando un papel muy importante en el combate a la infección [14]. Por otra parte, el papel de los anticuerpos es primordial en la protección contra la infección ya que los títulos de anticuerpos correlacionan con el nivel de protección para la evaluación de las vacunas convencionales [71], por lo que conocer la respuesta de anticuerpos que montaron los pacientes de nuestro estudio contra este nuevo virus es crucial para elucidar cómo es el

comportamiento de la respuesta de anticuerpos durante la infección por el virus de influenza pandémica A (H1N1) 2009.

Finalmente, este trabajo constituye un ejemplo dentro de la importancia que tiene la ciencia en la resolución de problemas sociales, en este caso de salud pública, el cual que requería de atención inmediata y de la generación de conocimiento alrededor del fenómeno del que estábamos siendo testigos presenciales y el cual estaba ocurriendo en nuestro país y al cual nuestro grupo de investigación decidió estudiar. Este estudio también es una fracción de una labor conjunta en la cual se trata de caracterizar el fenómeno inflamatorio ante la infección con este nuevo virus, la respuesta de anticuerpos montada por estos pacientes así como la seroprevalencia en población mexicana antes y después de la epidemia [112-113].

CONCLUSIONES

Las características fenotípicas analizadas en las poblaciones de células mononucleares de sangre periférica de pacientes infectados con el nuevo virus de influenza pandémico A (H1N1) 2009, no son distintas a aquellas observadas en individuos con infección respiratoria de etiología diferente al virus pandémico. Aunque se sabe que el virus pandémico es antigénicamente distinto a los virus estacionales, la respuesta inflamatoria aguda celular montada por el organismo ante la infección por el nuevo virus es prácticamente idéntica a la que se llevaría a cabo durante una infección provocada por los virus de influenza estacionales.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Taubenberger, J.K. and D.M. Morens, *1918 Influenza: the mother of all pandemics*. Emerg Infect Dis, 2006. **12**(1): p. 15-22.
2. Gambotto, A., et al., *Human infection with highly pathogenic H5N1 influenza virus*. Lancet, 2008. **371**(9622): p. 1464-75.
3. Nicholson, K.G., J.M. Wood, and M. Zambon, *Influenza*. Lancet, 2003. **362**(9397): p. 1733-45.
4. Bouvier, N.M. and P. Palese, *The biology of influenza viruses*. Vaccine, 2008. **26 Suppl 4**: p. D49-53.
5. Peiris, J.S., et al., *Innate immune responses to influenza A H5N1: friend or foe?* Trends Immunol, 2009. **30**(12): p. 574-84.
6. Shinde, V., et al., *Triple-reassortant swine influenza A (H1) in humans in the United States, 2005-2009*. N Engl J Med, 2009. **360**(25): p. 2616-25.
7. Ahmed, R., M.B. Oldstone, and P. Palese, *Protective immunity and susceptibility to infectious diseases: lessons from the 1918 influenza pandemic*. Nat Immunol, 2007. **8**(11): p. 1188-93.
8. Garten, R.J., et al., *Antigenic and genetic characteristics of swine-origin 2009 A(H1N1) influenza viruses circulating in humans*. Science, 2009. **325**(5937): p. 197-201.
9. Smith, G.J., et al., *Origins and evolutionary genomics of the 2009 swine-origin H1N1 influenza A epidemic*. Nature, 2009. **459**(7250): p. 1122-5.
10. Khiabani, H., V. Trifonov, and R. Rabadan, *Reassortment patterns in Swine influenza viruses*. PLoS One, 2009. **4**(10): p. e7366.
11. Trifonov, V., H. Khiabani, and R. Rabadan, *Geographic dependence, surveillance, and origins of the 2009 influenza A (H1N1) virus*. N Engl J Med, 2009. **361**(2): p. 115-9.
12. Guo, Y., et al., *Analysis of hemagglutinin-mediated entry tropism of H5N1 avian influenza*. Virol J, 2009. **6**: p. 39.
13. Cameron, C.M., et al., *Gene expression analysis of host innate immune responses during Lethal H5N1 infection in ferrets*. J Virol, 2008. **82**(22): p. 11308-17.

14. Coro, E.S., W.L. Chang, and N. Baumgarth, *Type I IFN receptor signals directly stimulate local B cells early following influenza virus infection*. J Immunol, 2006. **176**(7): p. 4343-51.
15. Creagh, E.M. and L.A. O'Neill, *TLRs, NLRs and RLRs: a trinity of pathogen sensors that co-operate in innate immunity*. Trends Immunol, 2006. **27**(8): p. 352-7.
16. Takeuchi, O. and S. Akira, *Innate immunity to virus infection*. Immunol Rev, 2009. **227**(1): p. 75-86.
17. Gilliet, M., W. Cao, and Y.J. Liu, *Plasmacytoid dendritic cells: sensing nucleic acids in viral infection and autoimmune diseases*. Nat Rev Immunol, 2008. **8**(8): p. 594-606.
18. Alexopoulou, L., et al., *Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3*. Nature, 2001. **413**(6857): p. 732-8.
19. Diebold, S.S., et al., *Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA*. Science, 2004. **303**(5663): p. 1529-31.
20. Pichlmair, A., et al., *RIG-I-mediated antiviral responses to single-stranded RNA bearing 5'-phosphates*. Science, 2006. **314**(5801): p. 997-1001.
21. Jewell, N.A., et al., *Differential type I interferon induction by respiratory syncytial virus and influenza A virus in vivo*. J Virol, 2007. **81**(18): p. 9790-800.
22. Thomas, P.G., et al., *The intracellular sensor NLRP3 mediates key innate and healing responses to influenza A virus via the regulation of caspase-1*. Immunity, 2009. **30**(4): p. 566-75.
23. Ichinohe, T., et al., *Inflammasome recognition of influenza virus is essential for adaptive immune responses*. J Exp Med, 2009. **206**(1): p. 79-87.
24. Lopez, C.B., et al., *TLR-independent induction of dendritic cell maturation and adaptive immunity by negative-strand RNA viruses*. J Immunol, 2004. **173**(11): p. 6882-9.
25. Allen, I.C., et al., *The NLRP3 inflammasome mediates in vivo innate immunity to influenza A virus through recognition of viral RNA*. Immunity, 2009. **30**(4): p. 556-65.

26. Luk, J., P. Gross, and W.W. Thompson, *Observations on mortality during the 1918 influenza pandemic*. Clin Infect Dis, 2001. **33**(8): p. 1375-8.
27. Maines, T.R., et al., *Avian influenza (H5N1) viruses isolated from humans in Asia in 2004 exhibit increased virulence in mammals*. J Virol, 2005. **79**(18): p. 11788-800.
28. Lee, C.W., et al., *Characterization of highly pathogenic H5N1 avian influenza A viruses isolated from South Korea*. J Virol, 2005. **79**(6): p. 3692-702.
29. Perrone, L.A., et al., *H5N1 and 1918 pandemic influenza virus infection results in early and excessive infiltration of macrophages and neutrophils in the lungs of mice*. PLoS Pathog, 2008. **4**(8): p. e1000115.
30. Melendi, G.A., et al., *Cytokine profiles in the respiratory tract during primary infection with human metapneumovirus, respiratory syncytial virus, or influenza virus in infants*. Pediatrics, 2007. **120**(2): p. e410-5.
31. de Jong, M.D., et al., *Fatal outcome of human influenza A (H5N1) is associated with high viral load and hypercytokinemia*. Nat Med, 2006. **12**(10): p. 1203-7.
32. Chan, M.C., et al., *Proinflammatory cytokine responses induced by influenza A (H5N1) viruses in primary human alveolar and bronchial epithelial cells*. Respir Res, 2005. **6**: p. 135.
33. Kaiser, L., et al., *Symptom pathogenesis during acute influenza: interleukin-6 and other cytokine responses*. J Med Virol, 2001. **64**(3): p. 262-8.
34. Wong, S.S. and K.Y. Yuen, *Avian influenza virus infections in humans*. Chest, 2006. **129**(1): p. 156-68.
35. Lee, N., et al., *Hypercytokinemia and hyperactivation of phospho-p38 mitogen-activated protein kinase in severe human influenza A virus infection*. Clin Infect Dis, 2007. **45**(6): p. 723-31.
36. Kosai, K., et al., *Elevated levels of high mobility group box chromosomal protein-1 (HMGB-1) in sera from patients with severe bacterial pneumonia coinfecting with influenza virus*. Scand J Infect Dis, 2008. **40**(4): p. 338-42.

37. Parrish, W. and L. Ulloa, *High-mobility group box-1 isoforms as potential therapeutic targets in sepsis*. *Methods Mol Biol*, 2007. **361**: p. 145-62.
38. Gonzalez-Roldan, N., et al., *Expression of triggering receptor on myeloid cell 1 and histocompatibility complex molecules in sepsis and major abdominal surgery*. *World J Gastroenterol*, 2005. **11**(47): p. 7473-9.
39. Ferat-Osorio, E., et al., *Triggering receptor expressed on myeloid cells-1 expression on monocytes is associated with inflammation but not with infection in acute pancreatitis*. *Crit Care*, 2009. **13**(3): p. R69.
40. Ferat-Osorio, E., et al., *The increased expression of TREM-1 on monocytes is associated with infectious and noninfectious inflammatory processes*. *J Surg Res*, 2008. **150**(1): p. 110-7.
41. Gibot, S. and A. Cravoisy, *Soluble form of the triggering receptor expressed on myeloid cells-1 as a marker of microbial infection*. *Clin Med Res*, 2004. **2**(3): p. 181-7.
42. Bouchon, A., et al., *TREM-1 amplifies inflammation and is a crucial mediator of septic shock*. *Nature*, 2001. **410**(6832): p. 1103-7.
43. Wong-Baeza, I., et al., *Triggering receptor expressed on myeloid cells (TREM-1) is regulated post-transcriptionally and its ligand is present in the sera of some septic patients*. *Clin Exp Immunol*, 2006. **145**(3): p. 448-55.
44. Aoki, N., et al., *Differential regulation of DAP12 and molecules associated with DAP12 during host responses to mycobacterial infection*. *Infect Immun*, 2004. **72**(5): p. 2477-83.
45. Bleharski, J.R., et al., *A role for triggering receptor expressed on myeloid cells-1 in host defense during the early-induced and adaptive phases of the immune response*. *J Immunol*, 2003. **170**(7): p. 3812-8.
46. Gibot, S., et al., *A soluble form of the triggering receptor expressed on myeloid cells-1 modulates the inflammatory response in murine sepsis*. *J Exp Med*, 2004. **200**(11): p. 1419-26.
47. Nystrom, P.O., *The systemic inflammatory response syndrome: definitions and aetiology*. *J Antimicrob Chemother*, 1998. **41 Suppl A**: p. 1-7.

48. Crowe, J.E., Jr., *Host responses to respiratory virus infection and immunization*. Curr Top Microbiol Immunol, 1999. **236**: p. 191-214.
49. Geissmann, F., S. Jung, and D.R. Littman, *Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties*. Immunity, 2003. **19**(1): p. 71-82.
50. Xu, H., et al., *Critical but divergent roles for CD62L and CD44 in directing blood monocyte trafficking in vivo during inflammation*. Blood, 2008. **112**(4): p. 1166-74.
51. Gill, Michelle A., et al., *Differential Recruitment of Dendritic Cells and Monocytes to Respiratory Mucosal Sites in Children with Influenza Virus or Respiratory Syncytial Virus Infection*. The Journal of Infectious Diseases, 2008. **198**(11): p. 1667-1676.
52. Gondois-Rey, F., et al., *Hepatitis C virus is a weak inducer of interferon alpha in plasmacytoid dendritic cells in comparison with influenza and human herpesvirus type-1*. PLoS One, 2009. **4**(2): p. e4319.
53. Kadowaki, N., et al., *Natural interferon alpha/beta-producing cells link innate and adaptive immunity*. J Exp Med, 2000. **192**(2): p. 219-26.
54. Trombetta, E.S. and I. Mellman, *CELL BIOLOGY OF ANTIGEN PROCESSING IN VITRO AND IN VIVO*. Annual Review of Immunology, 2005. **23**(1): p. 975-1028.
55. Radbruch, A., et al., *Competence and competition: the challenge of becoming a long-lived plasma cell*. Nat Rev Immunol, 2006. **6**(10): p. 741-50.
56. McHeyzer-Williams, L.J. and M.G. McHeyzer-Williams, *Antigen-specific memory B cell development*. Annu Rev Immunol, 2005. **23**: p. 487-513.
57. Testi, R., J.H. Phillips, and L.L. Lanier, *T cell activation via Leu-23 (CD69)*. J Immunol, 1989. **143**(4): p. 1123-8.
58. Cebrian, M., et al., *Triggering of T cell proliferation through AIM, an activation inducer molecule expressed on activated human lymphocytes*. J Exp Med, 1988. **168**(5): p. 1621-37.

59. Santis, A.G., et al., *Tumor necrosis factor-alpha production induced in T lymphocytes through the AIM/CD69 activation pathway*. Eur J Immunol, 1992. **22**(5): p. 1253-9.
60. De Maria, R., et al., *Triggering of human monocyte activation through CD69, a member of the natural killer cell gene complex family of signal transducing receptors*. J Exp Med, 1994. **180**(5): p. 1999-2004.
61. Sancho, D., M. Gomez, and F. Sanchez-Madrid, *CD69 is an immunoregulatory molecule induced following activation*. Trends Immunol, 2005. **26**(3): p. 136-40.
62. Rau, F.C., et al., *B7-1/2 (CD80/CD86) Direct Signaling to B Cells Enhances IgG Secretion*. J Immunol, 2009. **183**(12): p. 7661-7671.
63. Hui, D.S., *Review of clinical symptoms and spectrum in humans with influenza A/H5N1 infection*. Respirology, 2008. **13 Suppl 1**: p. S10-3.
64. Thomas, P.G., et al., *Cell-mediated protection in influenza infection*. Emerg Infect Dis, 2006. **12**(1): p. 48-54.
65. Topham, D.J., R.A. Tripp, and P.C. Doherty, *CD8+ T cells clear influenza virus by perforin or Fas-dependent processes*. J Immunol, 1997. **159**(11): p. 5197-200.
66. Mozdzanowska, K., et al., *A pulmonary influenza virus infection in SCID mice can be cured by treatment with hemagglutinin-specific antibodies that display very low virus-neutralizing activity in vitro*. J Virol, 1997. **71**(6): p. 4347-55.
67. Doherty, P.C., et al., *Effector CD4+ and CD8+ T-cell mechanisms in the control of respiratory virus infections*. Immunol Rev, 1997. **159**: p. 105-17.
68. Gerhard, W., et al., *Role of the B-cell response in recovery of mice from primary influenza virus infection*. Immunol Rev, 1997. **159**: p. 95-103.
69. Palladino, G., et al., *Virus-neutralizing antibodies of immunoglobulin G (IgG) but not of IgM or IgA isotypes can cure influenza virus pneumonia in SCID mice*. J Virol, 1995. **69**(4): p. 2075-81.
70. Brandtzaeg, P., *Overview of the mucosal immune system*. Curr Top Microbiol Immunol, 1989. **146**: p. 13-25.

71. Salomon, R. and R.G. Webster, *The influenza virus enigma*. Cell, 2009. **136**(3): p. 402-10.
72. Simmons, C. and J. Farrar, *Insights into inflammation and influenza*. N Engl J Med, 2008. **359**(15): p. 1621-3.
73. Monto, A.S., *Epidemiology of influenza*. Vaccine, 2008. **26 Suppl 4**: p. D45-8.
74. Monto, A.S., J.S. Koopman, and I.M. Longini, Jr., *Tecumseh study of illness. XIII. Influenza infection and disease, 1976-1981*. Am J Epidemiol, 1985. **121**(6): p. 811-22.
75. Treanor, J.J., et al., *Efficacy and safety of the oral neuraminidase inhibitor oseltamivir in treating acute influenza: a randomized controlled trial*. US Oral Neuraminidase Study Group. JAMA, 2000. **283**(8): p. 1016-24.
76. *Randomised trial of efficacy and safety of inhaled zanamivir in treatment of influenza A and B virus infections. The MIST (Management of Influenza in the Southern Hemisphere Trialists) Study Group*. Lancet, 1998. **352**(9144): p. 1877-81.
77. Kang, S.M., et al., *Influenza vaccines based on virus-like particles*. Virus Res, 2009. **143**(2): p. 140-6.
78. Couch, R.B., *Seasonal inactivated influenza virus vaccines*. Vaccine, 2008. **26 Suppl 4**: p. D5-9.
79. *Human infection with new influenza A (H1N1) virus: clinical observations from Mexico and other affected countries, May 2009*. Wkly Epidemiol Rec, 2009. **84**(21): p. 185-9.
80. Thompson, W.W., et al., *Mortality associated with influenza and respiratory syncytial virus in the United States*. JAMA, 2003. **289**(2): p. 179-86.
81. *Human infection with pandemic A (H1N1) 2009 influenza virus: clinical observations in hospitalized patients, Americas, July 2009 - update*. Wkly Epidemiol Rec, 2009. **84**(30): p. 305-8.
82. Fajardo-Dolci, G.E., et al., *[Epidemiological profile of mortality due to human influenza A (H1N1) in Mexico]*. Salud Publica Mex, 2009. **51**(5): p. 361-71.

83. Perez-Padilla, R., et al., *Pneumonia and respiratory failure from swine-origin influenza A (H1N1) in Mexico*. N Engl J Med, 2009. **361**(7): p. 680-9.
84. Neumann, G., T. Noda, and Y. Kawaoka, *Emergence and pandemic potential of swine-origin H1N1 influenza virus*. Nature, 2009. **459**(7249): p. 931-9.
85. Itoh, Y., et al., *In vitro and in vivo characterization of new swine-origin H1N1 influenza viruses*. Nature, 2009. **460**(7258): p. 1021-5.
86. Munster, V.J., et al., *Pathogenesis and transmission of swine-origin 2009 A(H1N1) influenza virus in ferrets*. Science, 2009. **325**(5939): p. 481-3.
87. Maines, T.R., et al., *Transmission and pathogenesis of swine-origin 2009 A(H1N1) influenza viruses in ferrets and mice*. Science, 2009. **325**(5939): p. 484-7.
88. Peiris, J.S., W.W. Tu, and H.L. Yen, *A novel H1N1 virus causes the first pandemic of the 21(st) century*. Eur J Immunol, 2009. **39**(11): p. 2946-2954.
89. Bermejo-Martin, J., et al., *Th1 and Th17 hypercytokinemia as early host response signature in severe pandemic influenza*. Critical Care, 2009. **13**(6): p. R201.
90. Osterlund, P., et al., *Pandemic H1N1 2009 influenza A virus induces weak cytokine responses in human macrophages and dendritic cells and is highly sensitive to the antiviral actions of interferons*. J Virol, 2010. **84**(3): p. 1414-22.
91. *Serum cross-reactive antibody response to a novel influenza A (H1N1) virus after vaccination with seasonal influenza vaccine*. MMWR Morb Mortal Wkly Rep, 2009. **58**(19): p. 521-4.
92. Hancock, K., et al., *Cross-reactive antibody responses to the 2009 pandemic H1N1 influenza virus*. N Engl J Med, 2009. **361**(20): p. 1945-52.
93. Cao, B., et al., *Clinical Features of the Initial Cases of 2009 Pandemic Influenza A (H1N1) Virus Infection in China*. N Engl J Med, 2009. **361**(26): p. 2507-2517.
94. W.M.A. *Declaration of Helsinki*. 1989. Helsinki, Finland.
95. I.C.H. *Normas de Buenas Prácticas Clínicas*. 1996.

96. *Hospitalized patients with novel influenza A (H1N1) virus infection - California, April-May, 2009.* MMWR Morb Mortal Wkly Rep, 2009. **58**(19): p. 536-41.
97. Giamarellos-Bourboulis, E.J., et al., *Effect of the novel influenza A (H1N1) virus in the human immune system.* PLoS One, 2009. **4**(12): p. e8393.
98. Fesq, H., et al., *Programmed cell death (apoptosis) in human monocytes infected by influenza A virus.* Immunobiology, 1994. **190**(1-2): p. 175-82.
99. Hinshaw, V.S., et al., *Apoptosis: a mechanism of cell killing by influenza A and B viruses.* J Virol, 1994. **68**(6): p. 3667-73.
100. Price, G.E., H. Smith, and C. Sweet, *Differential induction of cytotoxicity and apoptosis by influenza virus strains of differing virulence.* J Gen Virol, 1997. **78 (Pt 11)**: p. 2821-9.
101. Nichols, J.E., J.A. Niles, and N.J. Roberts, Jr., *Human lymphocyte apoptosis after exposure to influenza A virus.* J Virol, 2001. **75**(13): p. 5921-9.
102. Kurokawa, M., et al., *Influenza virus overcomes apoptosis by rapid multiplication.* Int J Mol Med, 1999. **3**(5): p. 527-30.
103. Wurzer, W.J., et al., *Caspase 3 activation is essential for efficient influenza virus propagation.* EMBO J, 2003. **22**(11): p. 2717-28.
104. Stray, S.J. and G.M. Air, *Apoptosis by influenza viruses correlates with efficiency of viral mRNA synthesis.* Virus Res, 2001. **77**(1): p. 3-17.
105. Anderson, P., et al., *CD3-negative natural killer cells express zeta TCR as part of a novel molecular complex.* Nature, 1989. **341**(6238): p. 159-62.
106. Mao, H., et al., *Influenza virus directly infects human natural killer cells and induces cell apoptosis.* J Virol, 2009. **83**(18): p. 9215-22.
107. Randolph, G.J., et al., *The CD16(+) (FcgammaRIII(+)) subset of human monocytes preferentially becomes migratory dendritic cells in a model tissue setting.* J Exp Med, 2002. **196**(4): p. 517-27.
108. Allaouchiche, B. and E. Boselli, *Soluble TREM-1 and the diagnosis of pneumonia.* N Engl J Med, 2004. **350**(18): p. 1904-5; author reply 1904-5.
109. Williams, D.L., et al., *Inhibition of LPS-induced NFkappaB activation by a glucan ligand involves down-regulation of IKKbeta kinase activity and*

- altered phosphorylation and degradation of I κ B α* . Shock, 2000. **13**(6): p. 446-52.
110. Imhof, B.A. and M. Aurrand-Lions, *Adhesion mechanisms regulating the migration of monocytes*. Nat Rev Immunol, 2004. **4**(6): p. 432-44.
111. Culley, F.J., *Natural killer cells in infection and inflammation of the lung*. Immunology, 2009. **128**(2): p. 151-63.
112. Pérez-Toledo, M., *Estudio de la respuesta de anticuerpos en pacientes infectados por el virus de influenza A (H1N1) durante el periodo inicial de la pandemia abril-mayo 2009*. 2010, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México: México D.F. p. 30.
113. Nuñez-Valencia, A., *Estudio retrospectivo de la seroprevalencia contra el virus de la influenza A(H1N1) en población mexicana, de 2007 a 2009*. 2010, Facultad de Química, Univesidad Nacional Autónoma de México: México D.F. p. 50.