



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Química

“Respuesta sérica de citocinas y quimiocinas en
mujeres embarazadas no vacunadas con sospecha
clínica de infección por virus de influenza AH1N1
2009”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

LUIS ANGEL FLORES MEJÍA



MÉXICO, D.F.

2011



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 PASTELIN PALACIOS

VOCAL: Profesor: CONSTANTINO III ROBERTO LOPEZ MACIAS

SECRETARIO: Profesor: LOURDES ANDREA ARRIAGA PIZANO

1er. SUPLENTE: Profesor: LAURA CECILIA BONIFAZ ALFONZO

2° SUPLENTE: Profesor: MARIO ADAN MORENO EUTIMIO

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

UNIDAD DE INVESTIGACIÓN MÉDICA EN INMUNOQUÍMICA (UIMIQ) DEL HOSPITAL DE ESPECIALIDADES DEL CENTRO MÉDICO NACIONAL SIGLO XXI DEL INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL (IMSS) E INSTITUTO NACIONAL DE PERINATOLOGÍA “DR. ISIDRO ESPINOSA DE LOS REYES”

ASESOR DEL TEMA: DRA. LOURDES ANDREA ARRIAGA PIZANO

(Nombre y firma)

SUPERVISOR TÉCNICO: M. EN C. ISMAEL MANCILLA HERRERA

(Nombre y firma)

SUSTENTANTE (S): LUIS ÁNGEL FLORES MEJÍA

(Nombre y firma)

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Armando Isibasi Araujo, por darme la oportunidad de trabajar en la unidad a su cargo y por la confianza depositada en mí, muchas gracias.

A la Dra. Lourdes Andrea Arriaga Pizano, cuya excelente tutoría ha sido de enorme ayuda para mi desarrollo como estudiante y persona, dentro y fuera del laboratorio, así como por las demostraciones de extrema confianza, dedicado interés y gran cariño hacia sus alumnos, de los cuales soy orgulloso integrante.

Muchísimas gracias por todo.

Al Dr. Constantino III Roberto López Macías, porque sin su entusiasmo y dedicación, de la cual nos contagia a todos, el proyecto no habría sido posible.

Al Dr. Eduardo Ferat Osorio, por la asesoría brindada en los aspectos clínicos, tanto teóricos como prácticos y administrativos, para la realización de este gran proyecto.

Al Dr. Rodolfo Pastelín Palacios, sin cuyas objetivas revisiones, aportaciones y dirección durante la escritura de este trabajo el proceso habría sido mucho más complicado. Muchas gracias por su generosa ayuda.

Al M. en C. Ismael Mancilla Herrera, por confiar en mi primero, y por el apoyo brindado en la realización de este trabajo. Gracias por su paciencia.

A todos los que laboran en el laboratorio (UIMIQ´S) por su ayuda y su buena vibra. Muchas gracias, no cambien nunca.

A mis padres por ayudarme siempre en todo lo que quiero hacer, sin esperar nada a cambio. Muchas gracias sin ustedes no sería quien soy.

A mis maestros y compañeros de la facultad de química, gracias por compartir su tiempo y esfuerzo.

ABREVIATURAS

CMN S.XXI	Centro Médico Nacional Siglo XXI
DC	Célula dendrítica
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dsRNA	RNA de doble cadena
A(H1N1) 2009	Virus de influenza pandémica A(H1N1) 2009
HA	Hemaglutinina
IFN	Interferón
IL	Interleucina
IMSS	Instituto Mexicano del Seguro Social
IPS	Promotor estimulador de interferón
LRR	Repetidos ricos en leucina
M	Proteína de matriz
MCP	Proteína quimioatrayente de monocitos
MDA5	Gen asociado a diferenciación de melanoma 5
MIP	Proteína inflamatoria de macrófagos
mRNA _v	RNA mensajero viral
MyD88	Proteína de diferenciación mielóide de respuesta primaria 88
NA	Neuraminidasa
NF- κ B	Factor nuclear - κ B
NK	Células asesinas naturales
NLR	Receptor tipo NOD
NP	Nucleoproteína
NS	Proteína no estructural
OMS	Organización Mundial de la Salud
PA	Polimerasa ácida
PAMP	Patrón Molecular Asociado a Patógenos
PB	Polimerasa básica
PKR	Proteína cinasa R
PRR	Receptor de Reconocimiento de Patrón
RANTES	Proteína regulada en activación expresada y secretada por células T normales
RIG	Gene inducible por retinoides
RIP	Proteína de interacción de receptor
RLR	Receptor tipo RIG
RNA	Ácido ribonucleico
RNA _v	Ácido ribonucleico viral
RNP	Ribonucleoproteína
rRT-PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa en Transcripción Reversa en tiempo real
SIRS	Síndrome de respuesta inflamatoria sistémica
ssRNA	RNA de cadena sencilla
T _c	Linfocito T citotóxico
TGF	Factor de crecimiento tumoral
TIR	Dominio Toll/Receptor de IL-1
TLR	Receptor tipo Toll
TNF	Factor de necrosis tumoral
TRADD	Dominios de muerte asociados a TRAF
TRAF	Factor asociado al receptor de TNF
TRIF	Inductor de interferón que contiene dominio TIR
vRNA _{pol}	RNA polimerasa viral dependiente de RNA

ÍNDICE

Resumen.....	1
Marco Teórico	3
<i>Influenza y el virus de Influenza</i>	4
<i>Virus epidémicos y pandémicos</i>	5
<i>Ciclo de replicación</i>	9
<i>Respuesta inmunológica del hospedero ante el virus</i>	11
<i>Respuesta inmune durante el embarazo</i>	16
Planteamiento del problema	17
Justificación	18
Hipótesis	18
Objetivo general	18
Objetivos particulares	19
Materiales y métodos	19
Resultados	24
Discusión	28
Conclusión	32
Referencias	33

Resumen

Durante el proceso infeccioso de los virus de influenza altamente patogénicos (como los causantes de las pandemias de gripe “gripe Española” en 1918 y la influenza aviar en Asia), y como recientemente se suscitó en 2009, por un virus de influenza A(H1N1), se encuentra exacerbada la producción de citocinas y quimiocinas pro-inflamatorias. Incrementos en la producción de estos mediadores inflamatorios se relacionan directamente con mayor incidencia de neumonía severa y/o enfermedad inflamatoria sistémica y mayor tasa de mortalidad. Aunque, también la ausencia o disminución de estos mediadores, puede relacionarse con una mayor tasa de replicación viral, severidad de la infección y tiempos de transmisibilidad más prolongados.

Dada la importancia de citocinas y quimiocinas para el mantenimiento de una respuesta inflamatoria eficiente, nos preguntamos si la concentración sérica de estos mediadores varía en mujeres infectadas con virus de influenza A (H1N1) 2009, de acuerdo a si están o no embarazadas. Con el suero colectado de 8 mujeres embarazadas infectadas, 14 de mujeres infectadas no embarazadas y mujeres no infectadas (4 embarazadas y 8 no embarazadas), se realizó la cuantificación de citocinas (TNF, IL-6 e IL-10) y quimiocinas (IP-10, IL-8, MCP-1 y MIG) a través del método de “arreglo de perlas evaluadas por citometría de flujo”. Observamos que las concentraciones séricas de TNF e IL-10 son significativamente mayores en las mujeres infectadas embarazadas en comparación con no embarazadas también infectadas (TNF: 54.1 +/- 13.6 vs 3.5 +/- 2.6 pg/mL; IL-10: 37.5 +/- 13.6 vs 7.4 +/- 7.3 pg/mL; $p < 0.05$). A diferencia de las mujeres no embarazadas, las embarazadas no elevan la concentración circulante de las quimiocinas IP-10 y MIG ante la infección con A(H1N1)2009 (IP-10: 308.4 +/- 235 vs 4270.8 +/- 1423.4 pg/mL; MIG: (243.5 +/- 220.2 vs 2748.8 +/- 1728.7 pg/mL) al infectarse con el virus pandémico.

Lo anterior sugiere que el embarazo modula diferencialmente la respuesta de citocinas ante la infección con el virus, por un lado permitiendo la presencia de TNF e IL-10 en suero, que en infecciones sin embarazo se mantienen bajas y por otro, impidiendo las altas concentraciones de quimiocinas en suero, que si bien

podrían favorecer al producto, también podrían resultar en mayor predisposición a complicaciones por la infección, ante el retraso en la eliminación del virus de vías respiratorias.

Marco teórico

En abril del 2009, en México se reportaron diversos casos atípicos de enfermedades respiratorias, los cuales fueron originados por un nuevo virus de influenza A(H1N1). En los meses siguientes el virus se extendió rápidamente entre los seres humanos, y el 11 de junio del 2009 la Organización Mundial de la Salud (OMS) clasificó a la propagación global del virus como un evento de interés internacional por lo que declaró alerta pandémica nivel 6. De esta manera, el mundo fue testigo del inicio de la primera pandemia del siglo XXI.

Dentro de los grupos con mayor riesgo de complicaciones debidas a las diferentes formas de infección del virus de influenza, se identificaron a las mujeres embarazadas. En este grupo de mujeres embarazadas, en quienes se ha reportado que ante infecciones por otros virus de influenza aumentan las tasas de abortos espontáneos, nacimientos prematuros, y sufrimiento fetal(1), la tasa de morbimortalidad se elevaba hasta 6 veces en comparación con mujeres no embarazadas infectadas con este virus pandémico A(H1N1)2009(2). Algunos grupos de investigación proponen que el mayor riesgo de complicaciones de la influenza que presentan las embarazadas es debido a la disminución funcional en la resistencia vascular, mecánica ventilatoria y capacidad de respuesta inflamatoria, que ocurren como parte de la adaptación al embarazo(3-5). Para la respuesta inmunológica se ha propuesto que un estado de inmunosupresión transitoria protege al producto de la concepción de ser rechazado, y que en el caso de infecciones virales, este estado de inmunosupresión puede condicionar que no se elimine el virus y/o se agreguen infecciones bacterianas(5). En modelos de ratón se ha verificado que una polarización de la respuesta de citocinas hacia Th1 resulta deletérea al embarazo(6, 7). En mujeres, múltiples estudios han tratado de establecer sí este patrón se repite, encontrándose variaciones de acuerdo al trimestre y nunca un perfil francamente Th1 o Th2, o bien, pro o anti-inflamatorio, aunque si se ha establecido que estados patológicos como las pérdidas gestacionales recurrentes y la preeclampsia se relacionan con elevadas concentraciones de citocinas pro-inflamatorias a nivel sistémico y local (adyacentes a la placenta)(8). A nivel sistémico pocos estudios han determinado

los niveles de citocinas en embarazo normal(6, 8-12), y hasta el momento no se sabe cuál es el estado de las citocinas circulantes (en suero) en el caso de mujeres infectadas con A (H1N1)2009.

Influenza y el Virus de Influenza

La influenza pandémica es una enfermedad respiratoria aguda, de aparición súbita e impredecible, que principalmente tiene repercusiones patológicas en las vías respiratorias y suele presentar altas tasas de morbilidad (10-20%) y mortalidad que puede ser tan alta como la reportada inicialmente para el virus A /H1N1(2009), que fue del 57.7% en adultos de 30 a 59 años(13). La influenza, tanto pandémica como estacional, es causada por virus miembros de la familia *Orthomyxoviridae*. Estos virus se clasifican en tres tipos, virus de tipo A, B y C, de acuerdo a sus propiedades antigénicas de dos proteínas características: de la nucleoproteína (NP) y de la proteína de matriz (M)(14, 15). A su vez Los virus de influenza tipo A se subclasifican de acuerdo a las diferencias antigénicas de las glicoproteínas de su superficie, la hemaglutinina (HA ó H) y la neuraminidasa (NA ó N). Hasta la fecha se conocen 16 subtipos antigénicos de H y 9 de N, aislados de aves acuáticas(16, 17), de las cuales únicamente tres H (H1, H2y H3) y 2 N (N1 y N2) han establecido linajes estables dentro de la población humana y han causado brotes epidémicos importantes, caracterizados por transmisión sostenida, amplia y de persona a persona(18).

Los virus de influenza se caracterizan por tener un genoma de ácido ribonucleico (RNA) de cadena sencilla y polaridad negativa, compuesto por ocho segmentos (tipos A y B) asociados a proteínas; este RNA está contenido dentro de una matriz proteica, que a su vez está envuelto por una bicapa lipídica derivada de la célula hospedera. Presentan formas diversas, desde esféricos con diámetros de aproximadamente 100nm, hasta filamentosos con incluso más de 300nm de longitud(17, 19). En la bicapa lipídica de la envoltura se encuentran ancladas las proteínas de superficie del virus H y N, en proporción aproximada de cuatro a uno, respectivamente; además se encuentra también la proteína de matriz 2 (M2), cuya

relación con respecto a la H es de 1 a 10. Esta capa compuesta por proteínas y lípidos cubre una envoltura cuya unidad estructural es la proteína de matriz 1 (M1). Dentro de esta última envoltura se encuentran, tanto los complejos ribonucleoprotéicos (RNP), conformados por los segmentos de RNA virales (RNA_v) asociados tanto a la nucleoproteína (NP) como a la RNA polimerasa heterotrimérica dependiente de RNA (vRNA_{pol}), como pequeñas cantidades de proteína de exporte nuclear o proteína no estructural 2 (NS2). La composición de la vRNA_{pol} incluye tres subunidades: dos polimerasas básicas (PB1 y PB2) y una polimerasa ácida (PA)(17).

El genoma de estos virus, se compone de ocho segmentos de RNA de cadena sencilla y polaridad negativa, que varían en longitud, entre 800 a 2500 nucleótidos y de una longitud total de 10 a 14.6 kilobases(16). Estos segmentos son nombrados de acuerdo al orden decreciente de su longitud en nucleótidos. Los segmentos 1, 2, 3, 4 y 5 codifican una proteína por segmento: PB2, PB1, PA, H y NP respectivamente. El segmento 6 codifica la N y el segmento 7 codifica para las proteínas M1 y M2, donde la expresión de la M2 se logra mediante un proceso de corte y empalme del RNA_v mensajero (mRNA_v). Finalmente, el segmento 8, además de contener la información para la síntesis de la NS2, codifica para la proteína no estructural 1 (NS1), que tiene propiedades antagonistas dirigidas contra la síntesis y acción de interferones tipo 1(16, 17).

Virus epidémicos y pandémicos

Durante una infección por virus de influenza estacional, denominada así por el aumento en el número de casos en temporada invernal(20), las manifestaciones sintomatológicas suelen tener cuadros clínicos de severidad media, caracterizados por la aparición de fiebre, tos, dolor de cabeza, postración, ataque al estado general e inflamación del tracto respiratorio superior(21). Estos síntomas persisten de 7 a 10 días y puede llegar a desarrollarse neumonía viral primaria o bacteriana secundaria, en menores de un año de edad (incluyendo a recién nacidos), adultos mayores de 60 años y en personas con enfermedades co-mórbidas (obesidad, diabetes, etc.)(22).

Este tipo de influenza (estacional), suele ser provocada por cepas virales como: A/California/7/2009 (H1N1), A/Perth/16/2009 (H3N2) y B/Brisbane/60/2008(23). Para evitar la propagación de estos virus y proteger, primordialmente de los grupos de riesgo, la mejor medida ha sido la vacunación, con lo que se ha logrado disminuir de 25% al 39% el número de hospitalizaciones y a su vez se disminuye del 39% al 75% la mortalidad general durante las temporadas de influenza(24). La vacuna que más frecuentemente se utiliza se genera en embrión de pollo y consiste en virus inactivados de tres cepas distintas que contienen los dos subtipos H3N2 y H1N1 del virus de tipo A y un virus de tipo B, las cuales se calcula su inclusión de acuerdo al comportamiento epidémico en los meses de noviembre a marzo previos (hemisferio norte)(13, 23).

Las diferentes cepas de influenza surgen a partir de mecanismos de mutación inherentes al proceso de replicación del virus. Entre estos mecanismos, la vRNAPol no tiene la capacidad de revisión al momento de insertar los nucleótidos durante la formación de los distintos RNAs, esto favorece la aparición de mutaciones puntuales sobre los diferentes genes del virus, ocasionando cambios ligeros en la estructura de las proteínas a sintetizarse. Si estos cambios se localizan en determinantes antigénicos importantes, especialmente en la H, los anticuerpos dirigidos contra los epitopos correspondientes no podrán ejercer su acción neutralizante de manera eficiente(13). A este fenómeno se le denomina deriva antigénica (antigenic drift) y es el causante de la diversidad observada durante las epidemias estacionales. Por otro lado, el genoma segmentado del virus permite que, si una célula hospedera es infectada por dos cepas distintas, se logre el intercambio de genes completos al momento del ensamblaje del virus, mutación conocida como cambio antigénico (antigenic shift). El resultado es la generación de un virus con la capacidad de sintetizar proteínas antigénicamente nuevas, contra las que el organismo no tiene inmunidad previa, dejando a la población susceptible de ser infectada y con el potencial de alcanzar magnitudes pandémicas(13).

Además de esta posibilidad de evadir la respuesta inmunológica, las cepas emergentes de virus de influenza pueden aumentar su patogenicidad y/o

virulencia. Así, las cepas altamente virulentas como las de A(H5N1) son capaces de afectar no solo vías respiratorias altas (como en el caso de la mayoría de las cepas estacionales), sino también vías respiratorias bajas, aumentando la probabilidad de generar neumonía(21). Enfocándonos en otro escenario, la aparición de nuevas cepas puede favorecer las respuestas inflamatorias severas que dan lugar a mayor daño de los tejidos afectados, con neumonitis o alveolitis que comprometen severamente el intercambio gaseoso. En modelos de macacos, se ha observado que la que la cepa (reconstruida) de influenza A(H1N1) 1918 tiene la capacidad, incluso en los primeros días de infección, de potenciar la respuesta inflamatoria sistémica. Esta desregulación de la respuesta inmune se relaciona con una mayor letalidad por neumonía (con tasas de mortalidad que alcanzan el 60%) (24, 25), de allí la preocupación ante el surgimiento de nuevos virus altamente patogénicos y con potencial pandémico como A(H1N1) de 1918, causante de la pandemia llamada “Gripe Española” de 1918, o A(H5N1). Interesantemente, estas cepas de influenza tipo A son de linaje aviar, y a diferencia de cepas humanas, tienen mayor afinidad por la unión α -2,3 del aSi, lo que favorece su interacción con epitelio respiratorio (alto y bajo) y digestivo, por lo que el cuadro clínico que generan incluye neumonía y diarrea. En este tipo de infección es frecuente encontrar viremia(21, 26).

Mientras que los virus epidémicos o estacionales suelen afectar más frecuentemente a grupos en los extremos de la vida durante la época invernal, los virus pandémicos suelen afectar a adultos jóvenes en épocas no invernales. La infección por el virus pandémico A (H1N1) 2009 en México alcanzó hasta enero del 2010, una cifra de 68788 infectados(2), con una tasa de mortalidad hasta del 57.7%, lo que quiere decir aproximadamente 1251 muertos(13). La distribución de las defunciones derivadas de complicaciones por la infección del virus de influenza A(H1N1) 2009 incluye a un importante número de personas con edades entre los 30 y 59 años(13). Este hecho suma al alto costo humano, un alto costo financiero, ya que son personas en edad económicamente activa. En este sentido, se ha calculado en México que al inicio de la pandemia, cada día había una pérdida económica de aproximadamente 57 millones de pesos lo que significa que para la

pandemia de 2009 representó una pérdida de alrededor de 3 trillones de pesos(13).

Algo que sí comparten los virus pandémicos y estacionales es la posibilidad de generar infecciones más graves y/o con mayor posibilidad de complicaciones en grupos específicos de la población. Estos son los denominados grupos de riesgo, que corresponden a aquellas personas que debido a ciertas características ya sea biológicas, física o sociales tienen mayor probabilidad de contraer la infección o de presentar complicaciones una vez que se infectan(20).

En el caso de influenza estacional los grupos de riesgo incluyen a: personas que se encuentran en los extremos de la vida (recién nacidos y ancianos), personas con obesidad mórbida, personas con asma, mujeres embarazadas, diabéticos, personas con enfermedades cardiovasculares y personas con enfermedad pulmonar crónica, entre otros(27-30). Para la pandemia causada por A (H1N1) 2009, los grupos de riesgo incluyeron a pacientes con enfermedades subyacentes como enfermedad pulmonar obstructiva crónica, diabetes, hipertensión y personas con condiciones subyacentes como: tabaquismo, obesidad y embarazo(31, 32).

En el caso de las mujeres embarazadas, este mayor riesgo se refleja en una prevalencia del 7% de pacientes embarazadas comparada con la prevalencia esperada de la infección en la población general calculada en el 1%(31). Reportes epidemiológicos difundidos en Estados Unidos, Canadá y Australia refuerzan el hallazgo de que el riesgo de hospitalización en gestantes aumenta a mayor duración del embarazo(31, 33, 34).

En relación con este aumento en la tasa de hospitalización, la Dirección General Adjunta de Epidemiología, de la Secretaría de Salud, en un el informe del 5 de enero del 2010, revela que del 1 de enero al 31 de diciembre del 2009, ocurrieron 177 defunciones maternas por neumonía y otras enfermedades respiratorias con una proporción de 16.3% en las causas de mortalidad materna(2); y de los ingresos a la unidad de cuidados intensivos de esta población de riesgo se reportaron complicaciones como: estrés respiratorio (53%), seguido de complicaciones obstétricas (16%), fiebre o sepsis (16%), enfermedad parecida a la influenza (9%) y exacerbación de asma (4%)(1).

Varias explicaciones se han buscado a esta mayor susceptibilidad que las mujeres embarazadas presentan a complicarse ante infecciones entre las que se encuentran factores hormonales que inducen inmunosupresión (como la progesterona)(5). Existen reportes sobre mujeres embarazadas en las regiones endémicas de malaria que son más susceptibles a la infección por malaria durante la primera mitad del embarazo y este riesgo disminuye gradualmente durante la segunda mitad(35). La fiebre de Lassa, causada por la infección con un arenavirus, mostró una mayor tasa de letalidad en mujeres embarazadas en particular en el tercer trimestre(36). Sin embargo, existen otros reportes, como el de mujeres embarazadas que son más resistentes que la población general a la infección por VIH(5, 37).

Ciclo de replicación

El virus ingresa por vía respiratoria, a partir de los estornudos o de la tos de los sujetos infectados. Debido a que las partículas virales no permanecen suspendidas en el aire, es necesario el contacto cercano entre las personas o por contacto de los virus que hubieran quedado en picaportes, dinero u otras superficies que impregnan las manos. Al llevarse las manos a la boca, la nariz o los ojos se produce el contagio(38-40).

El proceso de infección por el virus inicia por el reconocimiento del ácido N-acetilneuramínico, conocido también como ácido siálico (aSi), sobre la superficie de las células hospederas, misma que es reconocida y unida por la H de la superficie del virus y tiene mayor afinidad por las uniones α -2,6 y α -2,3, dependiendo del subtipo de virus involucrado(41). Durante la replicación del virus, la H es cortada en dos subunidades, la HA1 y HA2, por serin-proteasas del hospedero. El segmento HA1 contiene el sitio de reconocimiento antigénico, mientras que la HA2 media la fusión de la envoltura del virus con las membranas celulares.

Posterior al reconocimiento del aSi por la H, el material genético del virus es liberado en la célula hospedera por dos mecanismos. El primero, involucra el pH ácido endosomal que provoca un cambio conformacional en la H, exponiendo el

péptido de fusión que permite la combinación de la bicapa lipídica viral con la membrana del endosoma(42). El segundo involucra a la M2, cuya participación en la liberación de la partícula viral a través de la acidificación de la vesícula endosomal, puesto que funciona como un canal iónico que permite la entrada de iones H⁺ dentro del virus. Esta acidificación interrumpe las interacciones proteína-proteína de la cápside, así como la formación de poros, la fusión de membranas y la liberación de los RNP al citoplasma de la célula hospedera(17, 42).

Las RNP tienen elementos de localización nuclear que permite a estos complejos dirigirse hacia el interior del núcleo de la célula. Una vez dentro del núcleo, se lleva a cabo la síntesis de los diferentes RNAv, debido a modificaciones postranscripcionales que requieren los mRNA para su posterior traducción. Tales modificaciones incluyen la unión de 7-metilguanositri-fosfato a la posición 5' del mRNAv, tomados de RNAm de la célula hospedera, y el corte y empalme de algunos mRNAv(17). La vRNAPol utiliza los segmentos de polaridad negativa como moldes para sintetizar dos tipos de RNA de polaridad positiva: mRNAv, que son utilizados para la síntesis de proteínas virales después de ser modificados y RNA complementario, del cual se obtienen nuevos segmentos de RNAv de polaridad negativa que conformarán los nuevos genomas de la progenie viral. La salida de los RNAv involucra la interacción de la, tanto con la NP y el RNAv para la formación del RNP. Para mediar la salida de los RNP formados hacia el citoplasma a través de los poros nucleares se requiere de la proteína NS2.

Las proteínas H, N y M2 son sintetizadas a partir de mRNAv en ribosomas unidos a la membrana del retículo endoplásmico, en cuyo interior son plegadas y transportadas al aparato de Golgi para modificaciones postraduccionales. Las tres proteínas contienen señales de distribución hacia la zona apical de la célula (en células epiteliales), que las dirigen hacia esta zona de la membrana citoplasmática(19). Se reconoce la participación de M1 en la interacción entre el complejo NS2-RNP con las proteínas HA, NA y M2 para el empaquetamiento de estos componentes en la membrana de la célula hospedera(17). Para el ensamblaje de los nuevos viriones, las proteínas H, N y M2 son dirigidas hacia la membrana gracias a que contienen determinantes de asociación con balsas

lipídicas y transporte apical en su dominio transmembranal. La M1 no contiene estos elementos, pero posee otros correspondientes a unión de lípidos, RNP, RNA y NP, además de determinantes de asociación con las colas de H y N expuestas hacia el citoplasma, lo que sugiere que su transporte hacia la membrana es por unión a H y N. La participación de la M1 es crítica en los procesos de ensamblaje a medida que interactúa y favorece la interacción con RNP y NP, para mediar la salida del núcleo de estos complejos. Dentro del transporte de los complejos NP-RNP hacia el sitio de formación del virión se ha demostrado la interacción con microfilamentos de actina corticales y con balsas lipídicas(19).

La acumulación de proteínas H, N y M2 sobre la superficie de la célula, así como de la proteína M1 por debajo de esta, favorecen la localización y el comienzo del proceso de gemación, lográndose esto último debido a la interacción entre los lípidos de la bicapa y las interacciones M1-M1. En las zonas sin balsas lipídicas, M2 favorecen la fusión de la membrana. Cuando se ha completado la gemación, las HA continúan interactuando con los residuos de aSi de glicoproteínas y gangliósidos de la célula hospedera, hasta que la actividad de sialidasa de la N provoca el corte de estos residuos, logrando que la nueva partícula viral sea liberada. También remueve aSi de la envoltura del virus, lo que previene la agregación de partículas virales y aumenta la infectividad(17). Adicionalmente, la neuraminidasa realiza la degradación de las mucinas en el tracto respiratorio, permitiendo así la penetración del virus a través del epitelio respiratorio(17).

Respuesta inmunológica del hospedero ante el virus

La infección por virus de influenza no es un proceso independiente y apartado dentro de la célula hospedera, ya que esta última tiene la capacidad de reconocer un proceso infeccioso por agentes patógenos y generar señales de alarma, que ayudarán a articular la respuesta inmunológica. Este reconocimiento es llevado a cabo por proteínas denominadas receptores de reconocimiento de patrón (PRR, de sus siglas en inglés: *Pattern-Recognition-Receptor*), cuyos ligandos, patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP, de sus siglas en inglés: *Pathogen-Associated-Molecular-Pattern*), son estructuras conservadas entre diferentes

agentes infecciosos, desencadenando vías de señalización que derivarán en la activación de una variedad de factores de transcripción, promoviendo la expresión de genes involucrados en los procesos de inflamación e inmunidad, para culminar, en el mejor de los casos, con la eliminación de la infección(43).

Dentro de los principales grupos de PRRs encargados del reconocimiento de partículas virales, se encuentran los receptores tipo gen inducible por retinoides-1(RIG-1) (RLR, de sus siglas en inglés: RIG-Like Receptor), los receptores tipo Toll (TLR, de sus siglas en inglés: Toll-Like-Receptor) y los receptores tipo dominio de oligomerización de nucleótidos (NOD) (NLR, de sus siglas en inglés: NOD-Like Receptor)(44).

Dentro de los RLRs, el gen asociado a diferenciación de mieloma 5 (MDA5) es esencial para el reconocimiento de influenza A, mientras que la participación de RIG-1 es de gran importancia en iniciar la respuesta inmunológica(45). RIG-1 es una helicasa de RNA que se encuentra en el citoplasma, compuesta por dos dominios de reclutamiento de caspasas (CARD), un dominio de helicasa y un dominio represor. Los dominios helicasa y represor son importantes para el reconocimiento de su ligando, mientras que los CARD son esenciales para la señalización intracelular. Su ligando es el RNA de cadena sencilla (ssRNA) trifosfatado en la posición 5' y el reconocimiento puede ser directo con los segmentos del genoma viral o después de su síntesis por los mecanismos de replicación del virus(46).

Seguido del acoplamiento de RIG-1 con su ligando, por medio de sus dominios CARD, se asocia con una proteína adaptadora localizada en la membrana externa de la mitocondria, llamada promotor estimulador de interferón (IFN)- γ (IPS-1). Después de este acoplamiento, proteínas con dominios de muerte asociadas al receptor de factor de necrosis tumoral (TNF) (TRADD), o asociadas a Fad (FADD), forman un complejo multiprotéico junto con la proteína de interacción de receptor (RIP1) así como con el factor asociado al receptor de TNF (TRAF)-3, que a su vez activa a dos cinasas relacionadas al inhibidor B (IB), TBK1 e IKKi, cuya función es la activación de dos factores reguladores de IFN (IRF), IRF-3 e IRF-7. La

estimulación de RIG-1 también promueve la activación del factor nuclear κ B (NF- κ B) vía la interacción de FADD con las caspasas 8 o 10(43).

Los TLRs son receptores transmembranales que reconocen PAMPs a través de repetidos ricos en leucina (LRR) en su ectodominio. Su fracción citosólica contiene un dominio de interacción llamado Toll/IL-1 receptor (TIR), cuya función es la interacción con moléculas adaptadoras que también contienen este dominio, tales como la proteína de diferenciación mieloide de respuesta primaria 88 (MyD88) o el adaptador inductor de IFN- γ que contiene dominio TIR (TRIF)(47). Dentro de los TLRs involucrados en el reconocimiento del virus de influenza A son TLR-3 y -7/8, presentes en membranas endosomales(43). La señalización por TLR-3, disparada por el reconocimiento de RNA de doble cadena (dsRNA), es dependiente de TRIF, a diferencia de la vía inducida por la unión de ssRNA a TLR-7/8, que requiere la participación de MyD88, acidificación del endosoma y que es activada por el reconocimiento de ssRNA(48, 49). Estas cascadas de señalización culminan en la activación de los factores de transcripción IRF-3, IRF-5 e IRF-7, además de NF- κ B y ATFs-c-Jun(48). Estos último se translocan al núcleo para promover la expresión de genes que codifican proteínas involucradas en diversos procesos relacionados con la generación de un estado inflamatorio, mediante el reclutamiento de diversos tipos celulares del sistema inmunológico y la activación de los mismos, para llevar a cabo diversas acciones relacionadas con el procesamiento de antígenos, la generación de inmunidad a largo plazo y la resolución de la infección(47). Por otra parte, el virus de influenza puede activar al inflamasoma, plataforma proteica cuya función es la activación de caspasa-1 para el control de la maduración y secreción de citocinas como IL-1beta o IL-18(50). En el caso del virus de influenza, la infección puede activar al complejo NLRP3, conformado por la proteína adaptadora ASC, caspasa-1 y la plataforma NLRP3. Esta última contiene dominios de unión a nucleótido y oligomerización (NACHT), de reclutamiento de caspasas (CARD) y LRR, que determinan sus interacciones con otras proteínas y el reconocimiento de PAMP(50). En lo que respecta al virus de influenza, se sabe que para la activación del complejo NLRP3 en macrófagos y células dendríticas, se requiere de un mecanismo que involucra la expresión de pro-IL-1 β vía

activación de TLR-7 y la participación de la proteína M2 localizada en el aparato de Golgi, cuyo pH ácido origina el transporte de iones H⁺ hacia el citoplasma y este cambio iónico es detectado por NLRP3, induciendo su activación y permitiendo la posterior liberación de IL-1 β activada(51).

Dentro de las respuestas que se observan tras la activación de los receptores antes descritos, se encuentran los mecanismos de comunicación celular, y en estos se destacan la secreción de citocinas. Dentro de las principales actividades biológicas de estas moléculas se encuentra la quimiotaxis, la proliferación celular, la diferenciación celular, pro-inflamación (activación de la respuesta inmune innata, anti-inflamación, citotoxicidad, angiogénesis, etc.)(39, 40). Durante la infección por virus de influenza el epitelio de las vías respiratorias secreta diferentes quimiocinas, como lo son la proteína regulada en activación, expresada y secretada por células T normales (RANTES o CCL5), la proteína quimioatrayente de monocitos-1 (MCP-1 o CCL2) e interleucina-8 (IL-8 o CXCL8)(52, 53). Por otra parte, el epitelio es capaz de secretar las quimiocinas CXCL8, CXCL5 y CXCL1 provoca la migración temprana de neutrófilos y células NK al sitio de infección, tras la activación de sus receptores CXCR1 y CXCR2(54). Aunque la participación de los neutrófilos en la infección por virus de influenza aún no ha sido completamente dilucidada, se conoce que su capacidad de secretar TNF- α favorece el aclaramiento de cuerpos apoptóticos, estos últimos generados como consecuencia de la infección por el virus(55). Otras quimiocinas, como CXCL13, CCL19, CCL21, etc., se relacionan con mayor infiltración de linfocitos y monocitos activados hacia el epitelio respiratorio(40). Todas estas células convocadas hacia las vías aéreas tienen como principal función la eliminación de las células infectadas. Se ha asociado la sobre-expresión de estas quimiocinas con necrosis o daño pulmonar en presencia de grandes infiltrados de monocitos y neutrófilos(25, 53).

En cuanto a otras moléculas de comunicación intercelular, como las citocinas, se ha observado que líneas celulares de epitelio pulmonar humano expuestas a virus de influenza estacional muestran baja producción de IFN- α , IFN- β y de las citocinas pro-inflamatorias IL-1 β IL-6 o TNF- α (56).

En modelos de infección *ex vivo* con monocitos humanos (que en condiciones normales, producen citocinas inflamatorias y quimiocinas en cantidades no detectables en suero) y actividad fagocítica baja(52, 56), tras la infección por virus de influenza A, este fenotipo se revierte, llegando incluso a diferenciarse a DC derivadas de monocitos, que secretan citocinas pro-inflamatorias como IL-1 β , IL-6, TNF- α , IFN- α e IFN- β y quimiocinas como la proteína inflamatoria de macrófagos (CCL3 o MIP-1), CCL4 (MIP-1), CCL20 (MIP-3), CCL2, CCL5 y CXCL8(52, 56).

Las DCs convencionales (cDC) y plasmacitoides (pDC), tras su activación, vía TLR-3 y TLR-7 secretan citocinas como IL-6, IL-12, TNF- α , CXCL8, CXCL10, CCL5, CCL4 e importantemente grandes cantidades de IFN- α e IFN- β . Cabe destacar que entre las cDCs y las pDCs son capaces de producir IFN de tipo I, citocina relacionada con actividad anti-viral, ya que es capaz de activar a las células NK, y con ello favorecer el aclaramiento o contención de la infección por medio de la eliminación de células infectadas por medio de su activación vía señales activadoras e inhibitorias por reconocimiento de complejo principal de histocompatibilidad-I y posterior liberación de gránulos citolíticos. Estas células pueden ser activadas por la liberación de IL-12 proveniente de las DCs. En este evento, además se favorece la síntesis de IFN tipo I y citocinas inflamatorias. Los IFN tipo I logran conectar señales de retroalimentación con la producción de TNF, IL-1 e IL-6 en células residentes de pulmón para activar macrófagos alveolares, DC y células epiteliales, y al mismo tiempo iniciar un programa coordinado de expresión de quimiocinas, tras la infección por el virus(57, 58), iniciando con la liberación GRO- α , GRO- β , GRO- γ , NAP-2, e IL-8, induciendo reclutamiento de neutrófilos y linfocitos citotóxicos, gracias a sus receptores CXCR2 y CXCR6, respectivamente, y continuando con MCP-1, MIP-1 α , RANTES y MCP-2 reclutando linfocitos T de memoria y monocitos, estos últimos con la posibilidad de reponer la cantidad de células DC o macrófagos en el tejido pulmonar(59).

En cuanto a las citocinas TNF- α , IL-6 e IL-1 β , son citocinas de función múltiple, asociadas al desarrollo de varios síntomas característicos de la enfermedad, como fiebre, fatiga y anorexia(60). Sin embargo, en algunos estudios en infecciones en humanos, se ha observado que es IL-6 la encargada de dirigir la respuesta

inflamatoria a nivel sistémico, puesto que su elevación en vías nasales y en suero correlaciona con la presencia de síntomas generalizados (fiebre, dolor muscular, fatiga y cefalea) y de vías aéreas altas y bajas (congestión nasal, dolor en garganta, estornudos o tos, disnea y dolor en el pecho)(61). TNF e IL-1 son conocidas por su capacidad de activar neutrófilos y macrófagos, de elevar la expresión de moléculas de adhesión en el endotelio vascular, mediando así uno de los pasos iniciales para el reclutamiento de estas células al tracto respiratorio(18, 21, 22, 57).

Respuesta inmune durante el embarazo

El embarazo es una condición pro-inflamatoria y anti-inflamatoria, dependiendo de la etapa de gestación que se analice(62, 63). Para fines prácticos, los cambios en la respuesta inmune se distribuyen en diferentes momentos de cada uno de los trimestres del embarazo.

En el primer trimestre, ocurren la implantación, la placentación y la adaptación a la convivencia con el feto. Durante la implantación, el blastocisto tiene que romper el revestimiento epitelial del útero para la implantación, dañar el tejido del endometrio para invadir, seguido por la sustitución de trofoblasto por el endotelio y músculo liso vascular de los vasos sanguíneos maternos para garantizar un adecuado suplemento de sangre a la placenta(3). Todas estas actividades crean un verdadero "campo de batalla" entre células que invaden, células mueren y células que reparan. Un ambiente inflamatorio es necesario para garantizar la reparación adecuada del epitelio uterino y la eliminación de los restos celulares. Estos cambios pro-inflamatorios, asociados a cambios hormonales de manutención del embarazo, se considera que se continúan durante el primer trimestre(4).

La segunda fase inmunológica de embarazo, correspondiente al segundo y tercer trimestre (exceptuando el momento del parto), es, en muchos sentidos, el momento óptimo para la madre. Se trata de un período de rápido crecimiento y desarrollo del feto. La madre, la placenta y el feto son simbióticos, y la función inmunológica predominante es la inducción de un estado anti-inflamatorio. La mujer ya no sufre de náuseas y fiebre como lo hizo en la primera etapa, en parte

debido a que la respuesta inmune ya no es la función endocrina predominante(4, 5).

Por último, durante la última fase inmunológica de embarazo (tercer trimestre, cuando llega el momento del parto), el feto ha completado su desarrollo, todos los órganos son funcionales y se prepara para el mundo exterior. Ahora la madre tiene que resolver el embarazo, o sea entrar en trabajo de parto. Se ha propuesto que el inicio del trabajo de parto está íntimamente relacionado con la renovación de la inflamación local. El parto se caracteriza por un flujo de células inmunes en el miometrio para promover el recrudecimiento de la respuesta inflamatoria(62, 63). Este entorno pro-inflamatorio (que puede que sea localizado en útero-placenta y membranas amnióticas), promueve la contracción del útero, la expulsión del bebé y el alumbramiento (expulsión de la placenta).

Estas diferencias en las capacidades de la respuesta inmune se han evidenciado al determinar citocinas en los diferentes trimestres, donde se encontró que estas varían de acuerdo al trimestre de embarazo, generando un ambiente inflamatorio(9) regulado por la presencia de hormonas como la progesterona y relaxina; estudios en ratones, demuestran que para que se dé un adecuado desarrollo del embarazo es importante la polarización hacia una respuesta Th2(64) caracterizada por la producción de citocinas como IL-4 e IL-10, durante la etapa de desarrollo del feto. Cuando se pierde este control en la respuesta inflamatoria en el embarazo puede generar patologías como la preeclampsia, así como pérdida del producto(9). Por ello es importante monitorear la respuesta inflamatoria en mujeres embarazadas que se infectaron con el virus de influenza pandémica A(H1N1) 2009.

Planteamiento del problema

Dado a que en el 2009 apareció en México un nuevo virus de Influenza tipo A(H1N1), la OMS declaró la primera pandemia del siglo XXI; debido a que este nuevo virus presentó una alta patogenicidad, alta tasa de transmisibilidad y la capacidad de afectar a población de adultos jóvenes en edad reproductiva.

Si bien está bien establecido que las mujeres embarazadas constituyen un grupo de riesgo a complicaciones derivadas de la infección por influenza (tanto estacional como pandémica), hasta el momento muy poco se conoce de los mecanismos celulares y moleculares responsables de esta mayor susceptibilidad.

Por ello, en nuestro grupo de trabajo nos preguntamos:

¿Cómo modifica el embarazo las concentraciones séricas de citocinas y quimiocinas durante la infección por virus de influenza pandémica A(H1N1) 2009?

Justificación

Las mujeres gestantes constituyen un grupo de alto riesgo a la infección por el virus de influenza A(H1N1)2009; y aunque las características clínicas de esta enfermedad ya han sido reportadas, aún son desconocidos los aspectos celulares y moleculares originados en respuesta a la infección por esta nueva cepa de virus de influenza humana tipo A(H1N1) 2009.

Hipótesis

El estado de embarazo induce una menor concentración sérica de citocinas y quimiocinas en respuesta al virus de influenza pandémica A(H1N1) 2009.

Objetivo general

Determinar la concentración sérica de citocinas y quimiocinas en mujeres embarazadas y no embarazadas infectadas con el virus de influenza pandémica A(H1N1) 2009.

Objetivos particulares

- Cuantificar: TNF, IL-6 e IL-10 en suero de mujeres embarazadas y no embarazadas infectadas con el virus de influenza A(H1N1) 2009.
- Cuantificar: IP-10, IL-8, y MIG séricos en mujeres embarazadas y no embarazadas infectadas con el virus de influenza A(H1N1) 2009.
- Comparar las concentraciones entre los diferentes grupos de estudio.

Materiales y métodos

Diseño del estudio

Es un estudio longitudinal, prospectivo y descriptivo de casos y controles.

Universo de estudio

Pacientes no embarazadas, 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) o al Hospital General Regional No. 1 “Dr. Carlos McGregor Sánchez”, durante el periodo de abril de 2009 a febrero de 2010. Pacientes embarazadas con diagnóstico de influenza pandémica A(H1N1) 2009, provenientes del Instituto Nacional de Perinatología “Isidro Espinosa de los Reyes” o del Hospital General de México-SS.

Los voluntarios sanos incluyen estudiantes de medicina y personal diverso de la Institución (UIMIQ SMNS XXI), así como mujeres embarazadas sanas en el segundo y tercer trimestre, provenientes del Instituto Nacional de Perinatología “Isidro Espinosa de los Reyes”.

Sujetos de estudio

Los sujetos de estudio se dividirán en cuatro grandes grupos: pacientes embarazadas y no embarazadas con influenza A(H1N1) 2009, confirmada por PCR en tiempo real por transcripción reversa (rRT-PCR) (de aquí en adelante

denominados A(H1N1+); mujeres con embarazo normal (sanas) que se encuentren entre el segundo y tercer trimestre; mujeres no gestantes sanas en edad reproductiva (de aquí en adelante denominados A(H1N1)-).

Criterios de selección de sujetos de estudio

Las mujeres embarazadas con infección respiratoria por virus de influenza A(H1N1)2009 y pacientes con infección respiratoria a causa del mismo virus, fueron diagnosticados e ingresados al servicio de Medicina Interna del Instituto Nacional de Perinatología “Isidro Espinosa de los Reyes” o del Hospital General Regional No. 1 “Dr. Carlos McGregor Sánchez” (mujeres embarazadas) o al Hospital de Especialidades de Centro Médico Nacional Siglo XXI y al Hospital General Regional No. 1 “Dr. Carlos McGregor Sánchez” (pacientes no embarazadas), clasificados de acuerdo al resultado de la prueba rápida de diagnóstico realizada *in situ* y a la prueba confirmatoria por RT-PCR, realizada en el Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológica.

Los sujetos control fueron seleccionados al azar de entre estudiantes de medicina y personal diverso. Todas las participantes firmaron consentimiento informado y se sometieron a los siguientes criterios de selección de acuerdo a su condición:

Criterios de inclusión grupos control (mujeres no embarazadas sanas)

- De edad mayor a los 18 años.
- Sin sintomatología de alguna infección o enfermedad inflamatoria.
- Sin embarazo.
- Sin enfermedades crónico-degenerativas y/o inmunosupresoras.

Criterios de inclusión grupos control (mujeres embarazadas sanas)

- De edad mayor a los 18 años.
- Que se encuentran entre el segundo y tercer trimestre de embarazo
- Que no presentarán problemas o signos de enfermedad inflamatoria aguda
- Que no presentaran enfermedades crónico-degenerativas de base
- Que no presentarán enfermedades propias del embarazo como preeclampsia o diabetes gestacional.

Criterios de inclusión para pacientes (embarazadas y no embarazadas)

- De edad mayor a los 18 años.
- 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 38° C, cefalea intensa, mialgias, odinofagia, rinorrea, astenia, insuficiencia respiratoria, náusea, vómito y/o diarrea.
- Que no presentaran enfermedades crónico-degenerativas de base.
- Que se encuentran entre el segundo y tercer trimestre de embarazo (solo para las embarazadas).
- Que no presentarán enfermedades propias del embarazo como preeclampsia o diabetes gestacional (solo para las embarazadas).

Criterios de no inclusión

- Pacientes que decidan no tomar parte dentro del estudio mediante la firma de consentimiento informado.

Criterios de exclusión

- Muestras de sangre o suero no óptimas para su procesamiento.
- Expediente de seguimiento incompleto.

Tamaño de la muestra

Debido a la súbita aparición del virus pandémico y ya que el objetivo de este estudio es el análisis del proceso inflamatorio agudo asociado a la infección por este virus, se decidió analizar a pacientes que fueran atendidas dentro del periodo abril de 2009 a febrero de 2010, con diagnóstico probable de infección por virus de influenza y con posterior realización de la prueba confirmatoria por RT-PCR. La cantidad de pacientes captados durante este periodo de tiempo se comparó con un grupo equiparable de voluntarios sanos para conformar al grupo control (8 mujeres embarazadas A(H1N1)+, 14 mujeres no embarazadas A(H1N1)+, 8 mujeres no embarazadas sanas y 4 mujeres embarazadas sanas.

Descripción y definición operacional de las variables

Variables de control

- Diagnóstico de infección por virus de influenza.

Variable cuantitativa nominal, que se expresa como diagnóstico definitivo o negativo. Se consideró que el diagnóstico era definitivo cuando los pacientes, además de presentar el cuadro clínico descrito en los criterios de inclusión, contaban con el resultado, positivo o negativo, de la prueba confirmatoria para A(H1N1) 2009 por RT-PCR.

- Días entre aparición de síntomas y toma de muestra.

Variable cuantitativa continua que se expresa en días calendario.

- Evolución clínica.

Variable cualitativa ordinal, que se define como mejoría, agravamiento o deceso.

Variables de estudio

- Concentración de citocinas o quimiocinas en suero.

Variable cuantitativa continua, que se expresa como cantidad de citocinas o quimiocinas de estudio, en picogramos(μg), por volumen de suero, en mL.

Variables demográficas

- Edad.

Variable cuantitativa continua que se expresa en años calendario.

Consideraciones éticas

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

Procedimiento experimental

De cada sujeto de estudio que cumpliera con los criterios de inclusión se obtuvieron, por venopunción humeral, 10 mL de sangre periférica con previa asepsia de la zona. La sangre fue colectada en tubos sin anticoagulante por el método de vacío Vacutainer™ (BD™ Biosciences, San José, CA, USA). La sangre obtenida se centrifugó a 2500rpm por 10 minutos y posteriormente se colectaron, dentro de un área de nivel de bioseguridad 2 plus, alícuotas de 200 μL de suero en

tubos eppendorf de 600 μ L para su inmediata preservación por congelación a -70°C , hasta el momento de su análisis. De cada muestra obtenida y procesada, se registraron nombre y apellidos, clave (correspondiente a sus iniciales), número de alícuotas de suero obtenidas y tratamiento de la muestra realizado. Estos datos, junto con la historia clínica de cada paciente, conformaron una base de datos para el análisis posterior.

Las concentraciones de citocinas y quimiocinas se obtuvieron utilizando kits de arreglos citométricos en perlas (CBAs, por sus siglas en inglés: *Cytometric-Bead-Arrays*). Los kits utilizados fueron CBA Human Chemokine Kit (BD™ Biosciences, San Jose, CA, USA), para la medición de IL-8/CXCL-8, MIG/CXCL9, MCP-1/CCL2 e IP-10/CXCL-10 (*Límites de detección: 0.2pg/mL IL-8/CXCL8, 2.5pg/mL MIG/CXCL9, 2.7pg/mL CCL2/MCP-1 y 2.8pg/mL IP-10/CXCL10*) y CBA Human proinflammatory Cytokine Kit (BD™ Biosciences, San José, CA, USA) para la obtención de la concentración de IL-6, IL-8, IL-10, TNF (*Límites de detección: 2.4pg/mL IL-6, 4.5pg/mL IL-10, 3.8pg/mL TNF y 0.2pg/mL IL-8*). De cada kit se utilizaron 5 μ L de cada CBA, recubierta con anticuerpos dirigidos contra cada una de las proteínas a analizarse, realizándose mezclas específicas para cada kit y de volúmenes finales de acuerdo al número de muestras a analizarse; para la mezcla de perlas del kit de Th's se le realizó un cambio de medio, del buffer de dilución de fábrica a uno que asemeja la composición del suero, realizándose esto centrifugando la mezcla de perlas a 1000 rpm por 5 min, decantando inmediatamente y restituyendo el volumen con el buffer tipo suero. Se colocaron un volumen de cada mezcla de perlas en cada tubo de citometría rotulado con la clave de la muestra y kit correspondientes.

Dentro de las muestras a analizarse se incluyeron diez puntos de una curva estándar, (estándar de proteínas, ocho diluciones del estándar y un blanco), preparada de acuerdo a especificaciones del fabricante a partir de proteína liofilizada, específica de cada kit. Se agregaron 50 μ L de muestra, siendo suero, dilución o blanco, a su tubo rotulado correspondiente y se incubaron a temperatura ambiente por una hora, protegidos de la luz. Posteriormente se añadió un volumen de reactivo de detección, específico de cada kit, por muestra, siendo estos reactivos anticuerpos monoclonales dirigidos contra las proteínas a cuantificarse,

acoplados al fluorocromo ficoeritrina para los dos kits. Las muestras fueron analizadas con un citómetro de flujo FACSAria (BD™ Biosciences, San Jose, CA, USA), tras realizar el acondicionamiento del aparato con los controles de compensación de los kits. A los datos obtenidos se les realizó prueba no paramétrica de Mann-Whitney o Kruskal-Wallis, utilizando el programa GraphPad Prism versión 5.0 para Windows (GraphPad Software Inc).

Resultados

Se analizaron 34 muestras de suero en total, correspondientes a 8 pacientes embarazadas con sospecha clínica y confirmación por RT-PCR de infección por influenza A(H1N1) 2009, 14 mujeres no embarazadas con infección por virus de influenza A(H1N1) 2009, 4 mujeres embarazadas sanas y a 8 mujeres no embarazadas clínicamente sanas. Las características demográficas se resumen en la Tabla 1 e incluyen la edad, para la que solo fue significativamente mayor en el caso de las mujeres no embarazadas infectadas (37 años, límites de 20 a 78 años) en comparación con la edad promedio de mujeres no embarazadas no infectadas (23, límites de 21 a 25 años), mujeres embarazadas no infectadas (24 años) y mujeres embarazadas infectadas (26, límites de 19 a 34). En las semanas de gestación no encontramos diferencias significativas entre las embarazadas no infectadas e infectadas. Al comparar a las mujeres infectadas, tanto embarazadas como no embarazadas presentaron fiebre, pero mientras las no embarazadas presentaban leucocitosis, las embarazadas presentaron leucopenia, así como éstas últimas acudían por atención más tempranamente (1.5+/-0.5 días de evolución vs 5.3 +/- 6.8). La severidad de los casos registrados es mayor entre las mujeres que no estaban embarazadas, que si llegaron a presentar SIRS (5 casos de 14) y una defunción.

Tabla 1. Características demográficas.

	No Embarazadas A(H1N1)- n=8	Embarazadas A(H1N1)- n=4	No Embarazadas A(H1N1)+ n=14	Embarazadas A(H1N1)+ n=8
Edad Promedio (años)	22	24	37	26
Semanas de gestación	NA	23 +/- 4	NA	20.7+/- 9.1
Días de evolución influenza	NA	NA	5.3 +/- 6.8	1.5 +/- 0.5
Defunciones	NA	NA	1	0
SIRS	NA	NA	5	0
Leucopenia/Leucocitosis	NA	NA	Leucocitosis	Leucopenia
Fiebre	NA	NA	Si	Si
Frecuencia respiratoria	15-20	15-20	22.4 +/- 4.6	25.3 +/-5.8

Se obtuvieron las concentraciones séricas de las citocinas: IL-6, IL-10 y TNF utilizando el método de CBAs (ver material y métodos). Para las citocinas utilizadas, la curva de referencia obtuvimos valores de: IL-10: $m = 7.38$, $b = 0$, $r = 0.996$; TNF: $m = 3.463$, $b = 0$, $r = 0.998$; IL-6: $m = 7.225$, $b = 0$, $r = 0.994$; IL-8: $m = 2.972$, $b = 370.5$, $r = 0.991$; MCP-1: 5.584 , $b = 287.8$, $r = 0.996$; MIG: $m = 2.977$, $b = 602.5$, $r = 0.978$ e IP-10: $m = 11.95$, $b = 207,1$, $r = 0.996$. Observamos diferencia significativa en las concentraciones obtenidas para TNF y de IL-10, citocinas cuya concentración es mayor en las mujeres embarazadas infectadas por A(H1N1)2009 que en mujeres infectadas no embarazadas (TNF: 54.1 ± 13.6 pg/mL vs 3.5 ± 2.6 pg/mL; IL-10: 37.5 ± 13.6 pg/mL vs 7.4 ± 7.3 pg/mL; $p < 0.05$) (Figura 1a y 1c). Además, los niveles de TNF e IL-10 de las mujeres embarazadas infectadas son muy similares a los niveles de citocinas que detectamos en el suero de las mujeres no infectadas, tanto embarazadas (IL-10: 26.8 ± 4.9 pg/mL; TNF: 67.0 ± 20.4 pg/mL), como no embarazadas (IL-10: 31.2 ± 8.0 pg/mL; TNF: $64.6 \pm$

12.2 pg/mL). Para IL-6, no encontramos diferencias entre los diferentes grupos analizados (mujeres no infectadas no embarazadas 34.1 pg/mL +/- 7.0, mujeres no infectadas embarazadas 36.3 pg/mL +/- 3.7, mujeres infectadas no embarazadas 55.5 pg/mL +/- 94.1, mujeres infectadas embarazadas 60.3 pg/mL +/- 30.7) (Figura 1b).

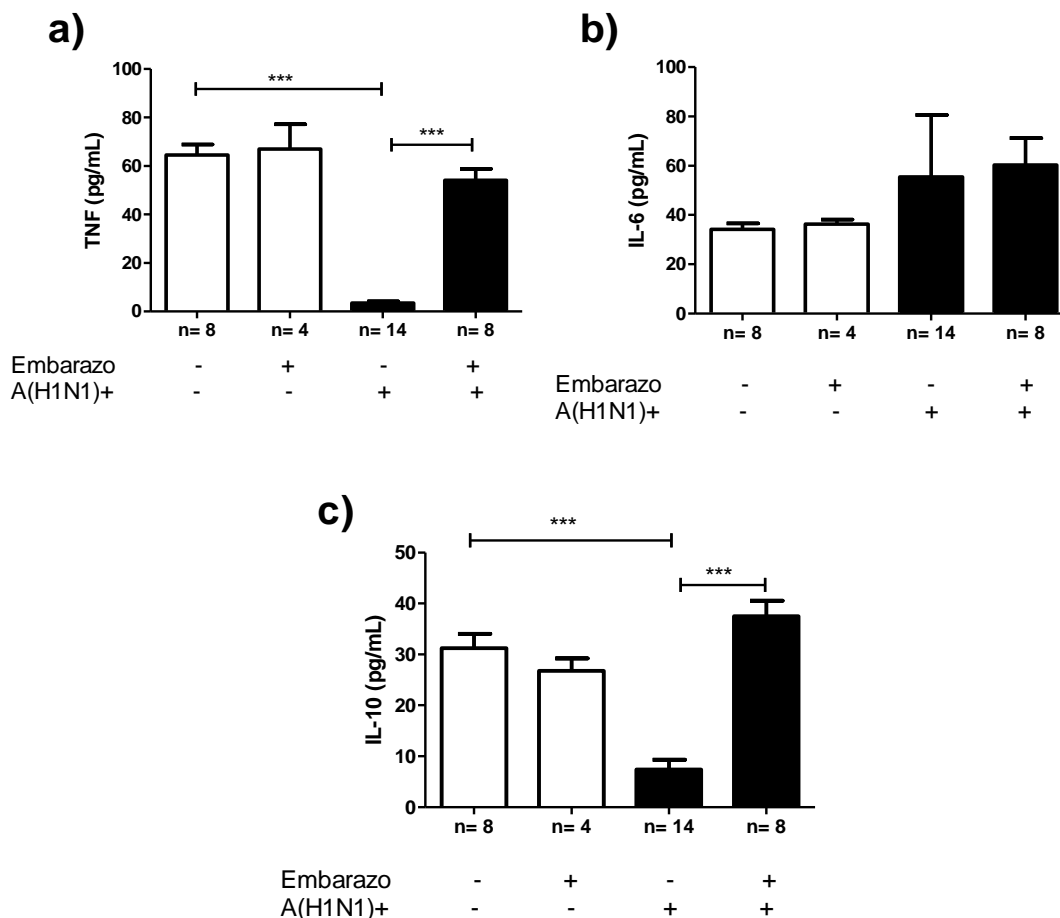


Figura 1. El embarazo se asocia con mayores concentraciones séricas de TNF e IL-10 ante la infección por el virus de influenza A(H1N1)2009. Se muestran los valores medios y la desviación estándar de las concentraciones séricas de **a)**TNF, **b)**IL-6 y **c)**IL-10 en los grupos de mujeres embarazadas o no (Embarazo + ó -, respectivamente) y que estaban infectadas (+ a A(H1N1)2009, correspondientes a las barras blancas) o no (- a A(H1N1)2009, correspondientes a las barras negras) con el virus pandémico de 2009. Prueba estadística no paramétrica de Kruskal-Wallis, con prueba de Dunn a posteriori; Significancia:*** p < 0.05.

En cuanto a los resultados acerca de la concentración sérica de quimiocinas IP-10, MCP-1, MIGe IL-8, observamos un aumento significativo de los niveles de IP-10, MCP-1 y MIG en pacientes no embarazadas infectadas (A(H1N1)+) con respecto al resto de los grupos: mujeres infectadas no embarazadas: IP-10 = 4270.8 pg/mL +/- 1423.4, MCP-1 = 974.7 pg/mL +/- 1303.7 y MIG = 2748.8 pg/mL

+/- 1728.7; mujeres no infectadas embarazadas IP-10 = 446.7 pg/mL +/- 427.1, MCP-1 = 72.3 pg/mL +/- 101.9 y MIG = 47.7 pg/mL +/- 79.9; mujeres no infectadas no embarazadas: IP-10 = 198.1 pg/mL +/- 202.7, MCP-1 = 56.9 pg/mL +/- 53.1 y MIG = 112.6 pg/mL +/- 140.2; y mujeres embarazadas infectadas: IP-10 = 308.4 pg/mL +/- 235.0, MCP-1 = 153.0 pg/mL +/- 168.8 y MIG = 243.5 pg/mL +/- 220.2 (Figura 2). Interesantemente, observamos que mientras la infección por el virus de influenza A(H1N1) favorece el aumento de IP-10, MCP-1 y MIG circulantes, en el caso de mujeres embarazadas infectadas, los niveles séricos de estas quimiocinas son significativamente menores, muy parecidos a los niveles de mujeres sin infección (tanto embarazadas como no embarazadas)(Figura 2a, 2b y 2c). Para el caso de IL-8, observamos la misma tendencia, con concentraciones mayores en el caso de mujeres no embarazadas e infectadas (404.5 pg/mL +/- 776.7) respecto al resto de los grupos: (mujeres no infectadas embarazadas = 54.6 pg/mL +/- 6.9; mujeres no embarazadas no infectadas = 46.2 pg/mL +/- 9.6 y mujeres embarazadas infectadas = 196.1 pg/mL +/- 211.0), aunque no encontramos diferencias estadísticamente significativas.

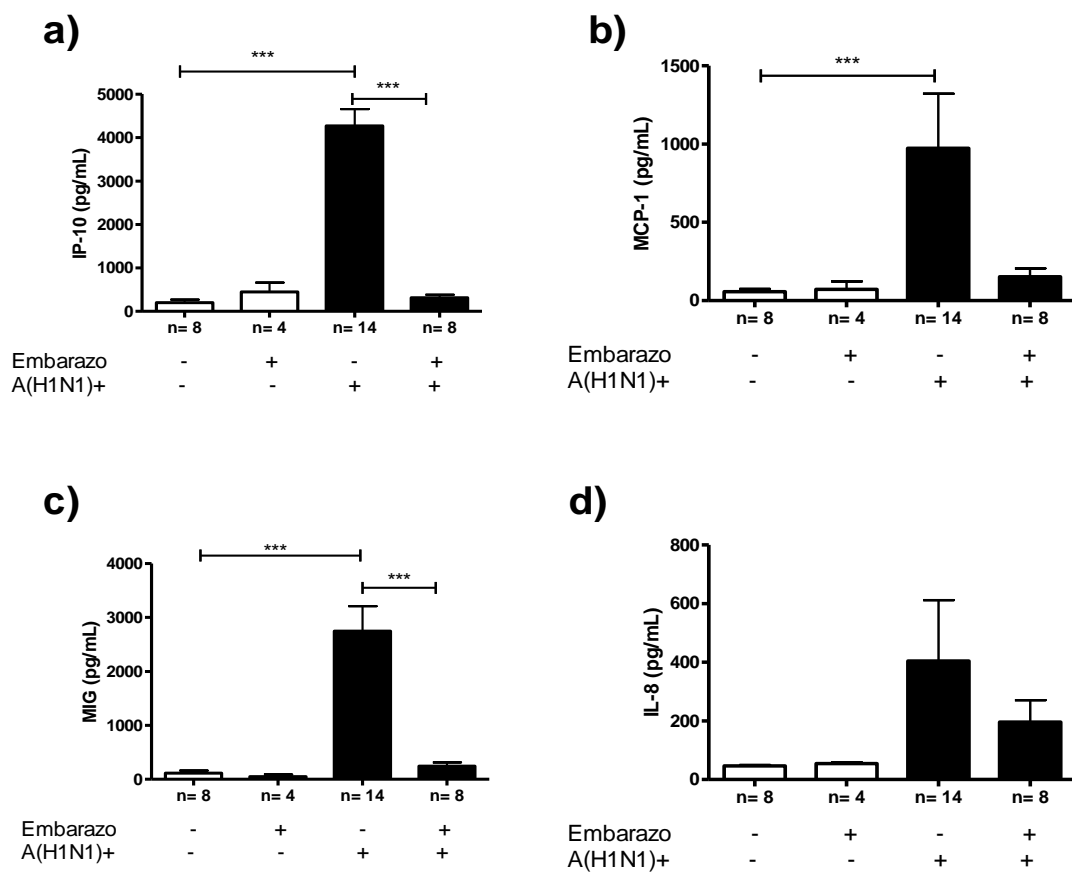


Figura 3. El embarazo mantiene baja la concentración sérica de quimiocinas ante la infección con A(H1N1) 2009 . Se realizó la comparación entre los grupos de mujeres analizados, embarazadas (Embarazo +) y no embarazadas (Embarazo-), tanto infectadas con el virus de influenza A H1N1 (2009) (A(H1N1)+, barras blancas), como no infectadas (A(H1N1)-, barras negras) para los niveles séricos de las quimiocinas **a)** IP-10, **b)** MCP-1, **c)** MIG y **d)** IL-8. Se muestran las medias de las concentraciones de cada grupo de estudio con barras de desviación estándar. Prueba estadística no paramétrica de Kruskal-Wallis, con prueba de Dunn a posteriori; *** $p < 0.05$.

Discusión

En la epidemia reportada durante el primer trimestre del año 2009 se reportaron un número elevado de casos de neumonía atípica en el grupo de la población en edad reproductiva (de 20 a 40 años de edad)(65). Al ser un nuevo virus, múltiples grupos en el mundo iniciaron la descripción del comportamiento de los pacientes frente a la infección. Surgieron estudios con la descripción epidemiológica(2, 66, 67), el cuadro clínico encontrado(68, 69) y sobre la asociación de los cambios fisiopatológicos pulmonares que se asociaban con mayor mortalidad de los pacientes(23, 25, 32-34). En cuanto al grupo de mujeres embarazadas, más allá

de la descripción de las gestantes como grupo de riesgo(2, 65-67, 70), hasta el momento, muy pocos estudios se han reportado respecto a la infección por este nuevo virus pandémico en mujeres embarazadas.

El peligro de la influenza durante el embarazo, particularmente durante las pandemias, ha sido poco estudiado, proponiéndose que el mayor riesgo de complicaciones es debido a varios cambios fisiológicos que ocurren durante la gestación, los cuales incluyen alteraciones cardiovasculares, respiratorias e inmunológicas(66). Adicionalmente, embarazadas con una enfermedad médica de fondo, como asma, tienen un riesgo más alto para desarrollar complicaciones por influenza (25). La respuesta inmunológica durante el embarazo ha sido pobremente definida; aunque se considera que se trata de un periodo de “tolerancia inmunológica” en donde el sistema inmune materno tolera la presencia y desarrollo del tejido alogénico que representa el producto de la concepción, esto se propone depende de un balance de la respuesta mediada por factores solubles (como las citocinas)(6, 8, 9, 11, 64), así como del balance en las respuestas humorales y celulares del sistema inmunológico.

En un trabajo previo de nuestro grupo de trabajo, analizamos la seroprevalencia de títulos protectores de anticuerpos anti-virus de influenza A(H1N1) 2009 en mujeres embarazadas y no embarazadas, y encontramos que es prácticamente la misma en mujeres no embarazadas que en mujeres que cursan con el tercer trimestre de embarazo(67), trimestre en el cual se presentan con mayor frecuencia los casos complicados ante una infección por el virus pandémico(2). Lo anterior sugiere que, al menos en lo referente a generar títulos protectores de anticuerpos ante el contacto con el virus circulante, la gestación no disminuye este tipo de respuesta inmune.

En propósito del presente estudio fue establecer, mediante la determinación de factores solubles (citocinas y quimiocinas), la respuesta inflamatoria sistémica de mujeres en condición de embarazo ante la infección del virus de influenza pandémica A(H1N1) 2009, y comparar estas determinaciones con las obtenidas en pacientes no embarazadas infectadas con el mismo virus, así como con un grupo de mujeres aparentemente sanas no infectadas embarazadas y no embarazadas.

Logramos incluir a un total de 34 mujeres, que se distribuyeron de la siguiente manera en los grupos de estudio: 14 para mujeres no embarazadas A(H1N1)+, 8 para embarazadas A(H1N1)+ y no embarazadas A/H1N1)- y 4 embarazadas sanas. Sí bien el número de sujetos es relativamente bajo, sobre todo en lo referente al grupo de embarazadas infectadas (n=8), el grupo fue seleccionado lo más homogéneo posible, incluyéndose a las pacientes embarazadas que además de presentar un cuadro clínico tipo influenza, se confirmará la presencia del virus por RT-PCR y que, además, no debían tener enfermedades crónico-degenerativas, autoinmunes o asociadas al embarazo que modificaran la capacidad de respuesta inflamatoria sistémica de las pacientes. La selección de pacientes, sin inclusión de pacientes previamente inmunocomprometidas, es importante, ya que se ha reportado que las condiciones como diabetes(71, 72) o lupus eritematoso sistémico(73) incrementan los niveles de citocinas circulantes, lo mismo que la preeclampsia(8-11). La homogenización de grupos se ha demostrado que disminuye la probabilidad de mal interpretación de datos(74). También en lo referente a los grupos de mujeres analizados, estos son bastante homogéneos en los datos demográficos en lo referente a las semanas de gestación (solo aplicable a las mujeres embarazadas infectadas y no infectadas), los datos clínicos que presentaban y que ninguna de ellas falleció. Ahora bien, respecto a la edad, el grupo de embarazadas es más “joven” que el grupo de infectadas no embarazadas, lo cual no pensamos que pueda tener mayor efecto en la concentración de citocinas, ya que existen estudios donde se comparan los niveles de citocinas entre diferentes edades y la diferencia entre sujetos de la tercera y cuarta década de la vida no varían significativamente(75, 76).

Al obtener las concentraciones de citocinas se muestra que en las mujeres no embarazadas A(H1N1)+, las concentraciones de IL-10 y de TNF son significativamente menores comparado con las poblaciones de mujeres embarazadas y en comparación con la población de voluntarias aparentemente sanas. Normalmente, en condiciones de no embarazo, se esperaría que las concentraciones de citocinas y quimiocinas derivadas de la infección por cualquier virus o patógeno fueran elevadas, con el fin de favorecer la inflamación, el reclutamiento celular al sitio de infección y así el control y la eliminación de la

enfermedad, sin embargo esto no se observa para el caso de TNF, donde la concentración es significativamente menor en pacientes no embarazadas infectadas, lo que puede ser causado por el mismo virus, ya que posee factores de virulencia como la proteína NS1, que regula a la baja la respuesta inflamatoria y la producción de interferones, como mecanismo de evasión ante la respuesta inmune(17, 21). Otra explicación para este fenómeno es que, debido a que la infección ocurre de forma primaria en células de epitelio respiratorio, es decir, el fenómeno es localizado, puede ser que el fenómeno quede localizado y no se pueden alcanzar en suero niveles elevados de esta citocina(21), sin embargo, esto no explica porque es diferente la concentración de citocinas entre mujeres infectadas embarazadas y no embarazadas. Por otro lado para el caso de las mujeres embarazadas infectadas se esperaría observar una baja en la respuesta inflamatoria para evitar reconocimiento y rechazo del aloinjerto(3, 4), que nosotros no observamos, ya que las concentraciones de TNF e IL-10 son significativamente más elevadas en mujeres infectadas embarazadas respecto a no embarazadas. Ahora bien, autores como Redman y Sargent sugieren que el embarazo es un estado “inflamatorio controlado” en donde la placenta genera estímulos inflamatorios y que, cuando el control se pierde, genera un aumento en la concentración de citocinas pro-inflamatorias se generan problemas como preeclampsia(9). En nuestro caso, podría ser que a pesar de los mecanismos virales que no permiten el aumento de citocinas, el embarazo favorezca la producción y liberación de estas citocinas al tener un menor umbral para inducir las respuestas inflamatorias o mecanismos de control anti-inflamatorio más comprometidos.

Para el caso de IL-10, en las mujeres embarazadas A(H1N1)+ es donde se observa la mayor concentración de esta citocina, siendo significativa solamente la diferencia con la población de mujeres no embarazadas A(H1N1)+. Esto se puede explicar debido a que durante el embarazo, la respuesta inflamatoria es suprimida durante las etapas intermedias (segundo trimestre y principios del tercer trimestre) mediante la producción de esta citocina y de TGF- β , lo cual genera la tolerancia del feto(6, 12); ya que un cambio en el tipo de producidas citocinas hacia un perfil Th1 (IL-6, IL-1 β , TNF- α , etc.), daría lugar a complicaciones del embarazo o a un

aborto(12). Es factible que el umbral de inducción de IL-10 sea más bajo en las embarazadas, como parte de los mecanismos de protección al producto y que en este caso la infección y/o niveles de citocinas inflamatorias derivadas de la presencia del virus, disparen más fácilmente la inducción de esta citocina o que este retardados los mecanismos de depuración de la misma.

En nuestros resultados encontramos también una disminución significativa de quimiocinas IP-10 y MIG que presentan las mujeres embarazadas A(H1N1)+, con respecto a las mujeres no embarazadas infectadas con el mismo virus, lo cual ya se ha reportado que en el embarazo se puede asociar con menor posibilidad de infiltración, lo que protege a la placenta y al producto del rechazo(6). La elevación que encontramos de estas quimiocinas en torrente sanguíneo de mujeres infectadas no embarazadas, que tenían una media de cuatro días de evolución, coincide con la migración de NK, neutrófilos, monocitos y DC hacia tracto respiratorio durante una infección viral, que se ha descrito previamente(57).

Las concentraciones de citocinas (permanencia) y quimiocinas (disminución) se puede correlacionar con las elevadas tasas de ingreso hospitalario que presenta esta población de riesgo(23, 68), así como con una mayor severidad de la infección, ya que si se inhibe la respuesta inflamatoria y el reclutamiento celular, no se puede llevar a cabo la eliminación del virus y la resolución de la enfermedad(5, 13, 28, 57). Por lo anterior, estas concentraciones diferenciales de citocinas y quimiocinas, podrían estar correlacionadas con la mayor susceptibilidad que las mujeres embarazadas presentan a las complicaciones frente a la infección.

Conclusión

El embarazo modula diferencialmente la respuesta de citocinas ante la infección con el virus, ya que: las concentraciones de TNF e IL-10 son mayores en mujeres embarazadas infectadas con influenza A(H1N1) 2009, en comparación con las mujeres no embarazadas infectadas con el mismo virus, el estado de embarazo disminuye la concentración sérica de IP-10 y MIG durante la infección por virus de influenza A(H1N1) 2009.

Referencias

1. Ellington, S. R., L. K. Hartman, M. Acosta, M. Martinez-Romo, L. Rubinson, D. J. Jamieson, and J. Louie. Pandemic 2009 influenza A (H1N1) in 71 critically ill pregnant women in California. *Am J Obstet Gynecol* 204:S21-30.
2. Torres-Ramírez, A. 2010. La influenza pandémica A(H1N1) en mujeres embarazadas. *Ginecología y Obstetricia de México* 78 (2):121-127.
3. Dekel, N., Y. Gnainsky, I. Granot, and G. Mor. Inflammation and implantation. *Am J Reprod Immunol* 63:17-21.
4. Loke, Y. W., and A. King. 2000. Immunology of implantation. *Baillieres Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 14:827-837.
5. Mor, G., and I. Cardenas. The immune system in pregnancy: a unique complexity. *Am J Reprod Immunol* 63:425-433.
6. Wegmann, T. G., H. Lin, L. Guilbert, and T. R. Mosmann. 1993. Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a TH2 phenomenon? *Immunol Today* 14:353-356.
7. Delassus, S., G. C. Coutinho, C. Saucier, S. Darche, and P. Kourilsky. 1994. Differential cytokine expression in maternal blood and placenta during murine gestation. *J Immunol* 152:2411-2420.
8. Saito, S., H. Umekage, Y. Sakamoto, M. Sakai, K. Tanebe, Y. Sasaki, and H. Morikawa. 1999. Increased T-helper-1-type immunity and decreased T-helper-2-type immunity in patients with preeclampsia. *Am J Reprod Immunol* 41:297-306.
9. Redman, C. W., G. P. Sacks, and I. L. Sargent. 1999. Preeclampsia: an excessive maternal inflammatory response to pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 180:499-506.
10. Saito, S., M. Sakai, Y. Sasaki, K. Tanebe, H. Tsuda, and T. Michimata. 1999. Quantitative analysis of peripheral blood Th0, Th1, Th2 and the Th1:Th2 cell ratio during normal human pregnancy and preeclampsia. *Clin Exp Immunol* 117:550-555.
11. Saito, S., N. Tsukaguchi, T. Hasegawa, T. Michimata, H. Tsuda, and N. Narita. 1999. Distribution of Th1, Th2, and Th0 and the Th1/Th2 cell ratios in human peripheral and endometrial T cells. *Am J Reprod Immunol* 42:240-245.
12. Wegmann, T. G. 1984. Foetal protection against abortion: is it immunosuppression or immunostimulation? *Ann Immunol (Paris)* 135D:309-312.
13. Lagace-Wiens, P. R., E. Rubinstein, and A. Gumel. Influenza epidemiology--past, present, and future. *Crit Care Med* 38:e1-9.
14. Tamura, S., and T. Kurata. 2004. Defense mechanisms against influenza virus infection in the respiratory tract mucosa. *Jpn J Infect Dis* 57:236-247.
15. Sullivan, S. J., R. M. Jacobson, W. R. Dowdle, and G. A. Poland. 2009 H1N1 influenza. *Mayo Clin Proc* 85:64-76.
16. Patrick R. Murray, E. J. B., James H. Jorgensen, Marie Louise Landry, Michael A. Pfaller.,. 2007. *Manual of Clinical Microbiology*.
17. Bouvier, N. M., and P. Palese. 2008. The biology of influenza viruses. *Vaccine* 26 Suppl 4:D49-53.
18. Nicholson, K. G., J. M. Wood, and M. Zambon. 2003. Influenza. *Lancet* 362:1733-1745.
19. Nayak, D. P., R. A. Balogun, H. Yamada, Z. H. Zhou, and S. Barman. 2009. Influenza virus morphogenesis and budding. *Virus Res* 143:147-161.
20. Monto, A. S. 2008. Epidemiology of influenza. *Vaccine* 26 Suppl 4:D45-48.
21. Kuiken, T., and J. K. Taubenberger. 2008. Pathology of human influenza revisited. *Vaccine* 26 Suppl 4:D59-66.

22. Taubenberger, J. K., and D. M. Morens. 2008. The pathology of influenza virus infections. *Annu Rev Pathol* 3:499-522.
23. OMS. 2010.
24. OMS. 2005.
25. Perez-Padilla, R., D. de la Rosa-Zamboni, S. Ponce de Leon, M. Hernandez, F. Quinones-Falconi, E. Bautista, A. Ramirez-Venegas, J. Rojas-Serrano, C. E. Ormsby, A. Corrales, A. Higuera, E. Mondragon, and J. A. Cordova-Villalobos. 2009. Pneumonia and respiratory failure from swine-origin influenza A (H1N1) in Mexico. *N Engl J Med* 361:680-689.
26. Gambotto, A., S. M. Barratt-Boyes, M. D. de Jong, G. Neumann, and Y. Kawaoka. 2008. Human infection with highly pathogenic H5N1 influenza virus. *Lancet* 371:1464-1475.
27. Barker, W. H., and J. P. Mullooly. 1980. Impact of epidemic type A influenza in a defined adult population. *Am J Epidemiol* 112:798-811.
28. LaForce, F. M., K. L. Nichol, and N. J. Cox. 1994. Influenza: virology, epidemiology, disease, and prevention. *Am J Prev Med* 10 Suppl:31-44.
29. Sabin, A. B. 1977. Mortality from pneumonia and risk conditions during influenza epidemics. High influenza morbidity during nonepidemic years. *JAMA* 237:2823-2828.
30. Stephenson, I., and M. Zambon. 2002. The epidemiology of influenza. *Occup Med (Lond)* 52:241-247.
31. Jain, S., L. Kamimoto, A. M. Bramley, A. M. Schmitz, S. R. Benoit, J. Louie, D. E. Sugerman, J. K. Druckenmiller, K. A. Ritger, R. Chugh, S. Jasuja, M. Deutscher, S. Chen, J. D. Walker, J. S. Duchin, S. Lett, S. Soliva, E. V. Wells, D. Swerdlow, T. M. Uyeki, A. E. Fiore, S. J. Olsen, A. M. Fry, C. B. Bridges, and L. Finelli. 2009. Hospitalized patients with 2009 H1N1 influenza in the United States, April-June 2009. *N Engl J Med* 361:1935-1944.
32. Kumar, A., R. Zarychanski, R. Pinto, D. J. Cook, J. Marshall, J. Lacroix, T. Stelfox, S. Bagshaw, K. Choong, F. Lamontagne, A. F. Turgeon, S. Lapinsky, S. P. Ahern, O. Smith, F. Siddiqui, P. Jouviet, K. Khwaja, L. McIntyre, K. Menon, J. Hutchison, D. Hornstein, A. Joffe, F. Lauzier, J. Singh, T. Karachi, K. Wiebe, K. Olafson, C. Ramsey, S. Sharma, P. Dodek, M. Meade, R. Hall, and R. A. Fowler. 2009. Critically ill patients with 2009 influenza A(H1N1) infection in Canada. *JAMA* 302:1872-1879.
33. 2010. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Updated: Estimates of 2009 H1N1 Influenza Cases, Hospitalizations and Deaths in the United States, April 2009 – April 10.
34. Webb, S. A., V. Pettila, I. Seppelt, R. Bellomo, M. Bailey, D. J. Cooper, M. Cretikos, A. R. Davies, S. Finfer, P. W. Harrigan, G. K. Hart, B. Howe, J. R. Iredell, C. McArthur, I. Mitchell, S. Morrison, A. D. Nichol, D. L. Paterson, S. Peake, B. Richards, D. Stephens, A. Turner, and M. Yung. 2009. Critical care services and 2009 H1N1 influenza in Australia and New Zealand. *N Engl J Med* 361:1925-1934.
35. Okoko, B. J., G. Enwere, and M. O. Ota. 2003. The epidemiology and consequences of maternal malaria: a review of immunological basis. *Acta Trop* 87:193-205.
36. Price, M. E., S. P. Fisher-Hoch, R. B. Craven, and J. B. McCormick. 1988. A prospective study of maternal and fetal outcome in acute Lassa fever infection during pregnancy. *BMJ* 297:584-587.
37. McNeely, T. B., D. C. Shugars, M. Rosendahl, C. Tucker, S. P. Eisenberg, and S. M. Wahl. 1997. Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 infectivity by secretory leukocyte protease inhibitor occurs prior to viral reverse transcription. *Blood* 90:1141-1149.
38. Bravo, T. C. 2010. Influenza: Avances recientes en virología molecular y prevención de la enfermedad. *Revista Mexicana de Patología Clínica* 57:59-93.
39. Bilyk, N., and P. G. Holt. 1995. Cytokine modulation of the immunosuppressive phenotype of pulmonary alveolar macrophage populations. *Immunology* 86:231-237.

40. Moser, B., M. Wolf, A. Walz, and P. Loetscher. 2004. Chemokines: multiple levels of leukocyte migration control. *Trends Immunol* 25:75-84.
41. Varki, A. C., R.D.; Esko, J.D.; Freeze, H.H.; Stanley, P.; Bertozzi, C.R.; Hart, G.W.; Etzler, M.E., 2008. *Essentials of Glycobiology*, New York.
42. Harrison, S. C. 2008. Viral membrane fusion. *Nat Struct Mol Biol* 15:690-698.
43. Takeuchi, O., and S. Akira. 2009. Innate immunity to virus infection. *Immunol Rev* 227:75-86.
44. Takeuchi, O., and S. Akira. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell* 140:805-820.
45. Kato, H., O. Takeuchi, S. Sato, M. Yoneyama, M. Yamamoto, K. Matsui, S. Uematsu, A. Jung, T. Kawai, K. J. Ishii, O. Yamaguchi, K. Otsu, T. Tsujimura, C. S. Koh, C. Reis e Sousa, Y. Matsuura, T. Fujita, and S. Akira. 2006. Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses. *Nature* 441:101-105.
46. Pichlmair, A., O. Schulz, C. P. Tan, T. I. Naslund, P. Liljestrom, F. Weber, and C. Reis e Sousa. 2006. RIG-I-mediated antiviral responses to single-stranded RNA bearing 5'-phosphates. *Science* 314:997-1001.
47. Akira, S., and K. Takeda. 2004. Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* 4:499-511.
48. Kawai, T., and S. Akira. 2006. TLR signaling. *Cell Death Differ* 13:816-825.
49. Lund, J. M., L. Alexopoulou, A. Sato, M. Karow, N. C. Adams, N. W. Gale, A. Iwasaki, and R. A. Flavell. 2004. Recognition of single-stranded RNA viruses by Toll-like receptor 7. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:5598-5603.
50. Schroder, K., and J. Tschopp. The inflammasomes. *Cell* 140:821-832.
51. Ichinohe, T., I. K. Pang, and A. Iwasaki. Influenza virus activates inflammasomes via its intracellular M2 ion channel. *Nat Immunol* 11:404-410.
52. Julkunen, I., T. Sareneva, J. Pirhonen, T. Ronni, K. Melen, and S. Matikainen. 2001. Molecular pathogenesis of influenza A virus infection and virus-induced regulation of cytokine gene expression. *Cytokine Growth Factor Rev* 12:171-180.
53. Matsukura, S., F. Kokubu, H. Noda, H. Tokunaga, and M. Adachi. 1996. Expression of IL-6, IL-8, and RANTES on human bronchial epithelial cells, NCI-H292, induced by influenza virus A. *J Allergy Clin Immunol* 98:1080-1087.
54. Esche, C., C. Stellato, and L. A. Beck. 2005. Chemokines: key players in innate and adaptive immunity. *J Invest Dermatol* 125:615-628.
55. Tate, M. D., A. G. Brooks, and P. C. Reading. 2008. The role of neutrophils in the upper and lower respiratory tract during influenza virus infection of mice. *Respir Res* 9:57.
56. Bussfeld, D., A. Kaufmann, R. G. Meyer, D. Gemsa, and H. Sprenger. 1998. Differential mononuclear leukocyte attracting chemokine production after stimulation with active and inactivated influenza A virus. *Cell Immunol* 186:1-7.
57. Kohlmeier, J. E., and D. L. Woodland. 2009. Immunity to respiratory viruses. *Annu Rev Immunol* 27:61-82.
58. Veckman, V., P. Osterlund, R. Fagerlund, K. Melen, S. Matikainen, and I. Julkunen. 2006. TNF-alpha and IFN-alpha enhance influenza-A-virus-induced chemokine gene expression in human A549 lung epithelial cells. *Virology* 345:96-104.
59. Piqueras, B., J. Connolly, H. Freitas, A. K. Palucka, and J. Banchereau. 2006. Upon viral exposure, myeloid and plasmacytoid dendritic cells produce 3 waves of distinct chemokines to recruit immune effectors. *Blood* 107:2613-2618.
60. Van Reeth, K. 2000. Cytokines in the pathogenesis of influenza. *Vet Microbiol* 74:109-116.
61. Hayden, F. G., R. Fritz, M. C. Lobo, W. Alvord, W. Strober, and S. E. Straus. 1998. Local and systemic cytokine responses during experimental human influenza A virus infection. Relation to symptom formation and host defense. *J Clin Invest* 101:643-649.

62. Romero, R., J. Espinoza, L. F. Goncalves, J. P. Kusanovic, L. A. Friel, and J. K. Nien. 2006. Inflammation in preterm and term labour and delivery. *Semin Fetal Neonatal Med* 11:317-326.
63. Romero, R., J. Espinoza, J. P. Kusanovic, F. Gotsch, S. Hassan, O. Erez, T. Chaiworapongsa, and M. Mazor. 2006. The preterm parturition syndrome. *BJOG* 113 Suppl 3:17-42.
64. Piccinni, M. P., C. Scaletti, E. Maggi, and S. Romagnani. 2000. Role of hormone-controlled Th1- and Th2-type cytokines in successful pregnancy. *J Neuroimmunol* 109:30-33.
65. 2009. Update: novel influenza A (H1N1) virus infection - Mexico, March-May, 2009. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 58:585-589.
66. CDC. 2009. Novel influenza A (H1N1) virus infections in three pregnant women - United States, April-May 2009. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 58:497-500.
67. Trinidad, C. C. G. 2011. Estudio de la seroprevalencia contra el virus de la influenza pandémica A/H1N1/ 2009 en mujeres gestantes. In *Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía*. IPN, Mexico, D. F. 51
68. 2009. Hospitalized patients with novel influenza A (H1N1) virus infection - California, April-May, 2009. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 58:536-541.
69. 2009. Human infection with new influenza A (H1N1) virus: clinical observations from Mexico and other affected countries, May 2009. *Wkly Epidemiol Rec* 84:185-189.
70. 2009. Guía de manejo clínico de influenza A(H1N1) en mujeres embarazadas. *Centro Nacional de Equidad de Género y Salud Reproductiva. Ssa*.
71. Hughson, A., I. Bromberg, B. Johnson, S. Quataert, N. Jospe, and D. J. Fowell. Uncoupling of Proliferation and Cytokines From Suppression Within the CD4+CD25+Foxp3+ T-Cell Compartment in the 1st Year of Human Type 1 Diabetes. *Diabetes*.
72. Kanamoto, Y., Y. Yamashita, F. Nanba, T. Yoshida, T. Tsuda, I. Fukuda, S. Nakamura-Tsuruta, and H. Ashida. A black soybean seed coat extract prevents obesity and glucose intolerance by up-regulating uncoupling proteins and down-regulating inflammatory cytokines in high-fat diet-fed mice. *J Agric Food Chem*.
73. Jacob, N., and W. Stohl. Cytokine disturbances in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res Ther* 13:228.
74. Diseño investigación. http://www.aniorte-nic.net/apunt_metod_investigac4_5.htm.
75. Beharka, A. A., M. Meydani, D. Wu, L. S. Leka, A. Meydani, and S. N. Meydani. 2001. Interleukin-6 production does not increase with age. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 56:B81-88.
76. Gardner, E. M., and D. M. Murasko. 2002. Age-related changes in Type 1 and Type 2 cytokine production in humans. *Biogerontology* 3:271-290.