



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

CUAUTITLÁN

**“ESTANDARIZACIÓN DE MÉTODOS DE INFECCIÓN DE LAS LÍNEAS
CELULARES MDCK, A549 Y HEP-2 CON VIRUS DE INFLUENZA A”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA:

IVAN TORRES MARTINEZ

ASESOR: Dr. LUIS HORACIO GUTIÉRREZ GONZÁLEZ

COASESOR: M. en C. ANA LAURA VÁZQUEZ MARTÍNEZ

CUAUTITLÁN IZCALLI, EDO. DE MÉX.

2013



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.



**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
ASUNTO: VOTO APROBATORIO



**DRA. SUEMI RODRÍGUEZ ROMO
DIRECTORA DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE**

**ATN: L.A. ARACELI HERRERA HERNÁNDEZ
Jefa de Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán**

Con base en el Art. 28 del Reglamento de Exámenes Profesionales nos permitimos comunicar a usted que revisamos la: **TESIS**

Estandarización de métodos de infección de las líneas celulares MDCK, A549 y HEP-2 con virus de influenza A

Que presenta el pasante: **Ivan Torres Martínez**
Con número de cuenta: **305344885** para obtener el Título de: **Químico Farmacéutico Biólogo**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO**.

ATENTAMENTE
“POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU”
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 21 de Marzo de 2013.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dra. Susana Elisa Mendoza Elvira	
VOCAL	Dr. Víctor Manuel Zendejas Buitrón	
SECRETARIO	M. en C. Ana Laura Vázquez Martínez	
1er SUPLENTE	M. en C. Tais Nopal Guerrero	
2do SUPLENTE	M. en C. Erik González Ballesteros	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 120).
HHA/pm

DEDICATORIAS

A Dios, Jesús, la vírgencita, San Cupertino y angelito de mi guarda por cuidar de mi familia, amigos y queridos, por hacerme invisible ante los ojos de las malas personas y por hacerme dar luz a aquellas personas que más lo necesitaban gracias.

A mi mamá:

Por darme todo el amor del mundo, apoyo incondicional y solo dios sabe lo mucho que tuviste que hacer por mí, por eso y por darme la maravillosa oportunidad de existir y ver convertir este pequeño gran logro en un hecho, gracias mamá y porque todo esfuerzo que hago desde que amanece hasta que anochece es dedicado a ti y porque mi agradecimiento jamás llegara a ser el suficiente TE AMO MAMA LUPE...

A mis hermanos:

Esto también les pertenece a ustedes Diana y Güero que no lo hubiera podido lograr sin su compañía, apoyo y motivación, por esos momentos de bullying, risas, imitaciones y burlas gracias hermanitos LOS AMO...

A mis abuelos:

Mamá Sofía y Papá Joaquín por haberme hecho lo que soy, por todo el cariño, amor y mano dura los amo con toda mi alma GRACIAS.

A mis tíos:

Maritn, Joaquín, Chenel y Chuchín por haber sido mis cuatro padres y regalarme un momento de sus vidas para verme crecer y quererme, por haberme compartido toda su sabiduría, y haberme inculcado los valores necesarios para ser una buena persona GRACIAS este logro también es suyo.

Norma, Gloria y Liz por haber compartido un poco de su tiempo, su cariño y amistad, por ser parte de mi familia y siempre tener apoyo de su parte GRACIAS.

A mis primos:

Pao, Pame, Mari, Joaco, Abis, Fer, Quique, Vivis, Alan Vale y Diego porque no quiero ser comparación, pero si un pequeño ejemplo del que persevera alcanza. Gracias por ser mi familia LOS AMO...

A mis amigos:

Aquellas personas que se cuentan con los dedos y que están en la buenas y en las no tan buenas siempre son una fuente revitalizante de energía gracias por su amistad Pablo y Gemelos

A mi asesor Dr. Luis Horacio Gutiérrez González:

En primer lugar por aceptarme como su alumno y ser mi asesor, por conducirme a este mundo fantástico de la ciencia y en segundo por ser una excelente persona y compartir una pequeña parte de su conocimiento gracias doc.

A la Dra. Ma. Eugenia Manjarrez:

Por permitirme realizar mi trabajo de tesis en su laboratorio, compartir su experiencia y por ser una excelente persona gracias.

Al Dr. Carlos, Prof. Fide, Gabriel, Manu, Dora, Lety, Elba, Cesar:

Por compartir su conocimientos, ser excelentes personas y por brindarme su amistad gracias. Este trabajo no hubiera sido posible sin ayuda.

A mis amigos de tesis:

A erika por asesorarme desde el primer día, el apoyo y el cariño gracias, por ser una linda persona, las bromas y por permitir que me comiera tus dulces gracias por todo.

A memo por ser una excelente persona y un peculiar amigo gracias y espero que algún día dios libere tu alma de ese demonio que traes dentro.

Este trabajo no hubiera sido posible sin la ayuda de los dos Gracias.

A mis amigos de la carrera:

A Vago, Perro Samuel y Fuerza rayos por ser compañeros y amigos del depa aunque nunca me quedara, al incomodo por marcarme de por vida y ponerme ese apodo (panes) gracias, a todos los del guayacol por momentos que jamás olvidare, chacales, algunos niños de farma y aquellos que convivieron conmigo gracias.

A Magali por ser mi consejera, tú sabes todo lo que viví estos últimos semestres y siempre tuviste un buen consejo, a ti Rodrigo por ser excelente persona. Gracias por ser buenos compañeros y brindarme su amistad.

A Lalo:

Por apoyarme en todo, pertenecer a la familia por comportarte como un padre, este logro también te pertenece GRACIAS.

A los papas de Karen:

Señora Adriana esta meta cumplida también le pertenece por todo el apoyo que me brindó y ser una linda persona conmigo como también permitir que su sala fuera una recámara para mí y tratarme como a un hijo además darme su confianza mil GRACIAS.

Señor Jaime por brindarme su apoyo y su peculiar manera de pensar y ser una excelente persona gracias.

Al prof. de tae: Juan Carlos

Por creer en mí, brindarme su apoyo y amistad por inculcarme disciplina, y por todos sus consejos gracias.

A tí:

Que me diste una gran experiencia de vida, pero que aun así me enseñaste a madurar y saber que la vida te da experiencias buenas y malas y si tuviera la oportunidad de escoger...

A mí pollito:

A tí Linda aunque pasamos momentos difíciles con un pequeño de dinero pero con mucho amor logramos disfrutar de lo más sencillo que nos da la vida, el Tkd fue el deporte más lindo al que me pudiste invitar y esos besos de gomitas y helados de chamoy lo más hermoso que me pudiste dar, gracias por todo el amor y comprensión, los feos momentos y los más bellos serán parte de mi pasado, presente y espero que seas parte de mi futuro. Por el apoyo incondicional y las desmadrugadas juntos gracias mi linda hermosa esto también te pertenece, también por darme una gran familia, panque, almendro y muffin, pio, animalito de dios, keiko y los que están por venir (ouuuuuu kiggggggg déjame) no tengo palabras para plasmar todo el aprecio que te tengo y gracias por este regalo, TE AMO UN MOLton chaparrita...

ÍNDICE

i. Resumen -----	ix
ii. Índice de cuadros-----	x
iii. Índice de figuras-----	x
iv. Abreviaturas-----	xii
1. Introducción	
1.1. ¿Qué es la influenza?	1
1.2. Tipos de influenza	2
1.2.1. Influenza A.....	3
1.2.2. Influenza B.....	3
1.2.3. Influenza C.....	3
2. Influenza H1N1 2009	
2.1. Antecedentes históricos	4
2.2 Primer caso clínico en México de la pandemia del 2009.	7
3. Características generales	
3.1. Estructura viral	8
3.2. Genoma viral	10
3.3. Proteínas virales	12
3.3.1. Proteína PB2.....	12
3.3.2. Proteína PB1 y PB1-F2.....	12
3.3.3. Proteína PA.....	13
3.3.4. Proteína HA.....	13
3.3.5. Proteína NP.....	13
3.3.6. Proteína NA.....	13
3.3.7. Proteína M1.....	13
3.3.8. Proteína M2.....	14
3.3.9. Proteína NS1.....	13
3.3.10. Proteína NS2.....	14

3.4. Variación antigénica	14
3.4.1. Deriva antigénica	15
3.4.2. Cambio antigénico	17
3.5. Ciclo de replicación	19
3.6. Respuesta inmune	22
4. Diagnóstico clínico	
4.1. Métodos de diagnóstico en el laboratorio	24
4.2. Aislamiento viral.....	29
4.3. Prueba de hemaglutinación	30
5. Cultivo celular	33
5.1. Línea celular MDCK	34
5.2. Línea celular Hep-2	34
5.3. Línea celular A549.....	34
6. Proteómica	
6.1. ¿Qué es la proteómica?	35
6.2. Análisis proteómico	35
7. Objetivos	
7.1. Objetivo general.....	39
7.1.2. Objetivos particulares	39

8. Hipótesis	-----40
9. Material y métodos	-----40
10. Resultados y análisis de resultados	-----42
11. Conclusiones	-----55
12. Referencias	-----57
13. Anexos	-----62

i. Resumen.

El virus de influenza es un importante patógeno en poblaciones humanas y animales, ya que es uno de los principales causantes de enfermedades respiratorias. Este virus produce alteraciones morfológicas en la célula hospedera al igual que modificaciones en la expresión génica, lo que se ve reflejado en cambios en el proteoma celular. Estos cambios pueden ser utilizados como herramientas en el diagnóstico temprano de la enfermedad. El uso de la proteómica nos ayuda a identificar las alteraciones y nos permite mejorar los métodos diagnósticos. En el presente trabajo se realizó la primera parte de un estudio proteómico, donde se llevó a cabo la estandarización de la infección de las líneas celulares epiteliales MDCK, Hep-2 y A549 con dos cepas de virus de influenza A (H1N1/A/México/4482/2009 y H1N1/A/PR/8/34). El efecto citopático característico de influenza nos ayuda a conocer el daño generado en células de estirpe animal y humana; aunque dicho efecto es fácilmente observable, se comprobó la infección mediante ensayos de hemaglutinación e inmunofluorescencia indirecta. También se realizó la extracción de proteínas a diferentes horas post-infección y se determinaron las condiciones óptimas para la separación de proteínas mediante electroforesis bidimensional. De esta manera se enviaron las muestras al INMEGEN para continuar con el estudio proteómico.

ii. Índice de cuadros.

Cuadro	Pag.
Cuadro 1: Epidemias y pandemias ocasionadas por el virus de la influenza a lo largo de la historia (1173-2009).	6
Cuadro 2: Composición de segmentos del genoma del virus de influenza A de la epidemia H1N1 2009.	11
Cuadro. 3: Métodos de diagnóstico para influenza por laboratorio.	25

iii. Índice de figuras.

Figura.	Pag.
Figura 1: Estructura del virus de influenza.	8
Figura 2: Representación de las glicoproteínas del virus de influenza.	9
Figura 3: Cómo se genera una nueva cepa de influenza mediante deriva antigénica.	16
Figura 4: Cómo se genera una nueva cepa de influenza mediante cambio antigénico.	18
Figura 5: Representación esquemática de las estructuras de ácido siálico.	20
Figura 6: Representación del ciclo de replicación del virus de influenza.	22
Figura 7: Representación esquemática de la inducción de la inmunidad celular y humoral	23
Figura 8: Representación esquemática de hemaglutinación entre eritrocitos humanos tipo O	32
Figura 9: Representación esquemática de la prueba de IHA	32
Figura 10. Representación esquemática del principio de isoelectroenfoco.	36
Figura 11: Representación esquemática del proceso de separación por geles bidimensionales.	37

Figura 12. Titulación de virus de influenza H1N1/A/México/4482/2009 en células MDCK	43
Figura 13. Titulación de virus de influenza H1N1/A/PR/8/34 en células MDCK	43
Figura 14. Titulación de virus de influenza H1N1/A/México/4482/2009 en células HEP-2	44
Figura 15. Titulación de virus de influenza H1N1/A/PR/8/34 en células HEP-2	44
Figura 16. Células MDCK control	46
Figura 17. Células MDCK infectadas con la cepa H1N1/A/México/4482/México/4482/2009 a las 6hpi	46
Figura 18. Células MDCK infectadas con la cepa H1N1/A/México/4482/México/4482/2009 a las 12 hpi	46
Figura 19. Células MDCK infectadas con la cepa H1N1/A/México/4482/México/4482/2009 a las 24 hpi	46
Figura 20. Células MDCK control	47
Figura 21. Células MDCK infectadas con la cepa H1N1/A/PR/8/34 a las 6hpi	47
Figura 22. Células MDCK infectadas con la cepa H1N1/A/PR/8/34 a las 12hpi	47
Figura 23. Células MDCK infectadas con la cepa H1N1/A/PR/8/34a las 24hpi	47
Figura 24. Células Hep-2 control	48
Figura 25. Células Hep-2 infectadas con la cepa H1N1/A/México/4482/México/4482/2009 a las 24hpi	48
Figura 26. Células Hep-2 infectadas con la cepa H1N1/A/México/4482/México/4482/2009 a las 48hpi	48
Figura 27. Células Hep-2 infectadas con la cepa H1N1/A/México/4482/México/4482/2009 a las 72hpi	48
Figura 28. Células Hep-2 control	49
Figura 29. Células Hep-2 infectadas con la cepa H1N1/A/PR/8/34 a las 24hpi	49
Figura 30. Células Hep-2 infectadas con la cepa H1N1/A/PR/8/34 a las 48hpi	49
Figura 31. Células Hep-2 infectadas con la cepa H1N1/A/PR/8/34 a las 72hpi	49
Figura 32. Células A549 infectadas con la cepa H1N1/A/México/4482/2009	50
Figura 33. Células A549 infectadas con la cepa H1N1/A/México/4482/2009	50
Figura 34. Células A549 infectadas con la cepa H1N1/A/PR/8/34	50
Figura 35. Geles de SDS-PAGE lisado de células MDCK infectadas con la cepa H1N1/A/México/4482/2009.	51
Figura 36. Geles de SDS-PAGE lisado de células MDCK infectadas con la cepa H1N1/A/PR/8/34.	52
Figura 37. Geles de SDS-PAGE lisado de células Hep-2 infectadas con la cepa H1N1/A/México/4482/2009.	52
Figura 38. Geles de SDS-PAGE lisado de células Hep-2 infectadas con influenza H1N1/A/PR/8/34.	53
Figura 39. Gel bidimensional muestra de células MDCK Control sin infección a las 6 horas	54
Figura 40. Gel bidimensional muestra de células MDCK infectadas con la cepa H1N1/A/México/4482/2009 a las 6 hpi	54

v. Abreviaturas.

A549	Línea celular de carcinoma pulmonar humano
DNA	Ácido desoxirribonucleico
AP	Análisis Proteómico
RNA	Ácido ribonucleico
RNA _m	Ácido ribonucleico mensajero
ATCC	American type culture collection
BCA	Ácido Bicinconinico
CDC	Centros para el control y prevención de enfermedades de los Estados Unidos
CHAPS	3-(cloroamidopropil)-dimetilamonio-1-propanosulfato
CO ₂	Dióxido de carbono
Da	Dalton
DMEM	Medio esencial mínimo de Eagle modificado de Dulbecco
DMSO	Dimetil sulfóxido
DTT	Ditiotreitol
ECP	Efecto citopático
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)
EM	Espectrometría de masas
Gal	Galactosa
H ₂ O DDI	Agua destilada desionizada
HA	Hemaglutinina
HOAc	Ácido acético
hpi	horas post-infección
IEF	Isoelectroenfoque
INER	Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias
IPG	Gadientes de pH inmovilizados
IFN-β	Interferón beta
kDa	Kilodaltones
HCl	Ácido clorhídrico
KH ₂ PO ₄	Fosfato monopotásico
M1	Proteína de membrana M1
M2	Proteína de membrana M2
MALDI-TOF	Desorción/ionización láser asistida por matriz (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization)
MDCK	Línea celular Madin Darbin Cell Kidney
MEMC	Medio esencial mínimo completo
MeOH	Metanol
mM	Minimolar
MOI	Multiplicidad de infección
MS	Espectrometría de masas (Mass spectrometry)
NA	Neuraminidasa
Na ₂ HPO ₄	Fosfato disódico anhidro

NaCl	Cloruro de sodio
NaHCO ₃	Bicarbonato de sodio
NaHPO ₄	Fosfato disódico
NEP	Proteína de exportación nuclear
Nm	Nanómetros
NP	Nucleoproteínas
NS	Proteína no estructural
NS1	Proteína no estructural 1
NS2	Proteína no estructural 2
OMS	Organización mundial de la salud
OPS	Organización Panamericana de la salud
PA	Polimerasa ácida
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
PB1	Polimerasa básica 1
PB1-F2	Polimerasa básica 1
PB2	Polimerasa básica 2
PBS	Solución amortiguadora salino de fosfatos
pH	Potencial hidrógeno
pK	constante de disociación
PI	Punto isoeléctrico
PM	Peso molecular
PSA	Persulfato de amonio
Pv	Partículas virales
(p/v)	Relación peso volumen
RNP	Ribonucleoproteína
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa en transcripción reversa
SDS	Dodecil sulfato sódico
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico
SFB	Suero fetal bovino
T-25	T-Flask de 25 cm ²
Tris	Hidroximetil-aminometano
TEMED	N,N,N',N'-tetrametilendiamina
UHA	Unidad Hemaglutinante
VERO	Línea celular de riñón de mono verde
Vh	Volts por hora
(v/v)	Relación volumen/volumen
µg	Microgramos
µL	Microlitros
µm	Micras
2D-PAGE	Electroforesis bidimensional en geles de poliacrilamida

1. Introducción

1.1. ¿Qué es la influenza?

Algunas de las enfermedades respiratorias agudas de origen viral con mayor morbi-mortalidad a nivel mundial son aquellas provocadas por el virus sincitial respiratorio, seguidas por la influenza y parainfluenza (WHO, 2012). En México las enfermedades respiratorias agudas representan la segunda causa de muerte más común entre niños. Aproximadamente de un cuarto a la mitad de los casos de neumonía infantil parecen tener un agente etiológico principalmente viral, incluyendo virus sincitial respiratorio humano (VSR), virus parainfluenza y virus de la influenza (Bellos, Mulholland, O'Brien, Qazi, Gayer, y Checchi, 2010).

La influenza es provocada por un virus RNA de la familia Orthomyxoviridae que causa infecciones respiratorias en aves y mamíferos. Los brotes de influenza probablemente han ocurrido desde tiempos antiguos, y por lo menos 14 pandemias se han registrado desde 1510 [Taubenberger y Morens, 2009]. En los últimos 120 años se han registrado 6 pandemias en 1889, 1918, 1957, 1968, 1977 y 2009. En el siglo pasado, la pandemia de influenza española de 1918-1919 cobró unas 50 millones de vidas, la Asiática (1957) y de Hong Kong (1968-1969) resultaron en 1-2 millones de muertes cada una (Pyle, 1986; Beveridge, 1991). Estas pandemias se han relacionado con mutaciones en el tipo A. En la actualidad, el virus de influenza tipo A afecta entre el 10 y el 20% de la población de los E.U.A., y puede ser responsable de 40.000 muertes anuales (Brammer, Murray, Fukuda, Hall, Klimov y Cox, 2002). La pandemia de gripe más reciente fue reportada por primera vez en México y Estados Unidos en 2009. Desde la pandemia de influenza documentada en 1918-1920, ha habido pandemias de gripe que han resultado en millones de muertes en el mundo, la tasa de mortalidad puede alcanzar hasta 2,0%, como en el caso de la pandemia de 1918-20. Además de los brotes de influenza pandémica, las epidemias de influenza estacional se producen en todo el mundo cada año y como resultado hay de tres a cinco millones de casos severos y entre 250,000 y 500,000 muertes cada año. Las infecciones de influenza son causadas por los tipos A, B o C; la mayoría de los casos en humanos se deben a virus tipos A o B. Específicamente, la influenza A se pueden clasificar en varios subtipos de acuerdo con la combinación de sus moléculas de superficie, la hemaglutinina (HA) y la

neuraminidasa (NA). Hay 17 subtipos de HA (H1-H17) y 10 subtipos de NA (N1-N10) (Tong, Rivaller, Conrardy, Castillo, Chen 2012). Mientras que los de tipos B y C tiene sólo un subtipo (Hatta, y Kawaoka, 2003).

Esta enfermedad es altamente contagiosa y se transmite fácilmente a través de aerosoles y gotas de las vías respiratorias de personas infectadas por contacto directo, a través de toser o estornudar, o por las manos contaminadas con secreciones respiratorias. Los adultos son más infecciosos desde el primer día antes del inicio de los síntomas hasta siete días después. Cuando la gripe se introduce en una casa entre el 20 y 60% de las personas expuestas eventualmente muestran evidencia serológica o virológica de la infección. Esta enfermedad puede afectar a todos los grupos de edad, pero las tasas de infección son más altas entre los niños pequeños que eliminan virus y son una fuente potencial de infección en las cohortes de mayor edad, mientras que las tasas de enfermedad grave, complicaciones y la muerte son más altas en personas de 65 años de edad, así como en personas con enfermedades crónicas cardíacas o respiratorias. Los datos recogidos en Michigan (E.U.A.) en Japón y en Rusia indican que la vacunación masiva de niños en edad escolar se correlaciona con un tipo reducido de enfermedad respiratoria en todas las edades, lo que sugiere que a mayor escala de inmunización en la infancia podría reducir significativamente las epidemias de gripe (WHO, 2009).

1.2. Tipos de influenza

En estudios filogenéticos se ha encontrado que los tres tipos de virus de influenza A, B y C tienen un ancestro común, sin embargo han divergido a tal grado que los rearrreglos genéticos (el intercambio de segmentos de RNA viral entre diferentes virus) sólo pueden ocurrir entre virus del mismo tipo (Córdova, Valdespino y Ponce, 2010).

Como ya se mencionó el virus de influenza se clasifica en tres tipos: A, B y C, que corresponden a tres géneros de los cinco existentes además de Isavirus y Thogotovirus dentro de la familia Orthomyxoviridae. (Córdova et al., 2010).

1.2.1. Influenza A

Los virus de influenza tipo A infectan a una amplia variedad de aves y mamíferos, incluyendo humanos, y se dividen en subtipos con base en las glicoproteínas presentes en la superficie del virus, la hemaglutinina (HA) y la neuraminidasa (NA). (Córdova et al., 2010) La gran diversidad de la influenza A se atribuye a la mutación genética y la recombinación de genes que se produce por el intercambio de los segmentos del genoma mientras el huésped es infectado con diversos subtipos al mismo tiempo. (Huang, Banner, Fang, Derek, Kanagasabai y Kelvin, 2011)

1.2.2. Influenza B

El virus de influenza B infectan primordialmente a humanos y dado que sólo existe un subtipo de ellos, tienen un bajo potencial pandémico, aunque si pueden provocar enfermedades respiratorias serias. (Córdova et al., 2010)

En contraste, este tipo viral tiene una tasa de mutación más lenta debido a su limitado tropismo sobre el hospedero, por lo que la recombinación génica es rara. Por consiguiente, hay mucho menos variantes de la influenza B. De este modo se sabe que hasta la fecha, todos los brotes de influenza B sólo se encuentran como epidemias regionales. (Huang et al., 2011)

1.2.3. Influenza C

El virus de influenza C causa enfermedades respiratorias moderadas en humanos y algunos animales, debido en parte a que es más estable ante cambios genéticos. Este tipo de influenza, que ha sido poco estudiado, no se clasifica en subtipos. (Hatta y Kawaoka, 2003)

La diferencia más importante a nivel de proteínas entre la influenza A, B y la del tipo C es que tiene una glicoproteína de envoltura que se llama HEF (hemaglutinina-esterasa-fusión), que desempeña las funciones de la hemaglutinina y la neuraminidasa. (Hatta, y Kawaoka,2003)

2. La pandemia del 2009

Como acontecimiento más reciente el virus de la pandemia de influenza 2009 A/H1N1 se extendió por todo México, en una serie de tres olas pandémicas, en la primavera, verano y otoño de 2009, que se asociaron con una alta incidencia de mortalidad en otros países (Chowell, Echevarría, Viboud, Simonsen y Miller, 2010). Por lo que se informó que los casos de la nueva influenza A (H1N1) comenzaron a surgir en marzo de 2009 en México, y en las dos primeras semanas de abril empezaron a ser identificados en México y California, este brote de influenza condujo al primer informe realizado por el gobierno de México ante la Organización Panamericana de la Salud (PAHO) el 12 de abril. (Hsieh, Velasco, Lee y Lim, 2009)

2.1. Antecedentes históricos

Aun cuando por mucho tiempo se ignoró el agente causal de la influenza, la enfermedad fue conocida en la antigüedad como un padecimiento respiratorio. Su nombre surge de la creencia de que la enfermedad era causada por influjo de las estrellas que tenían una influencia sobre la aparición de la enfermedad, es por eso que se llama influenza. A lo largo de la historia de la humanidad se han identificado numerosas pandemias de influenza y se considera que la influenza es la gran peste que no ha podido ser controlada por el hombre. (Ayora, 1999).

A lo largo de los últimos 400 años, las epidemias de influenza han sido reportadas en muchos países. La epidemia del siglo XVI en Inglaterra y la del XVIII en Estados Unidos han sido reconocidas como influenza, aun sin el conocimiento preciso del agente causal (Ayora, 1999).

En los pasados 125 años, ha habido por lo menos seis grandes pandemias comenzando en 1889, 1918, 1957, 1968, 1977 y 2009. A partir de 1918 circuló la influenza H1N1, que fue sustituida en 1957 por el virus H2N2 de la llamada influenza asiática. De manera similar, una nueva cepa pandémica que llegó en 1968, la llamada influenza de Hong-Kong, contenía un cambio a H3N2 y rápidamente sustituyó por completo al virus H2N2. A partir de 1977 la influenza H1N1 ha convivido con la H3N2 en todo el planeta. Técnicas seroarqueológicas (probando los anticuerpos de gente que vivió durante estas epidemias)

han demostrado que la cepa de 1890 fue un virus H2N8, y la cepa de 1918 fue un virus H1N1, el cual apareció de nuevo en 1977 y está aún en circulación junto con la cepa H3N2. (Ayora, 1999).

En mayo de 1997, un virus de influenza fue aislado del aspirado traqueal de un niño de 3 años de edad en Hong-Kong, quien murió días después de su admisión al hospital. El niño murió de neumonía por influenza, síndrome respiratorio agudo, síndrome de Reye, fallo multiorgánico y coagulación intravascular diseminada. Se demostró que el subtipo de virus era influenza A H5N1, un subtipo que no había sido previamente identificado en los seres humanos. El virus de influenza A H5N1 cumple dos de los tres importantes criterios para un nuevo virus de influenza con carácter pandémico: la capacidad para replicarse en los seres humanos y la ausencia de anticuerpos a este virus en la población humana. El tercer criterio es el potencial de dispersarse de hombre a hombre, lo cual no ha sido observado hasta ahora, en el cuadro 1 se muestran las pandemias más importantes ocasionadas por el virus de la influenza a lo largo de la historia. (Ayora, 1999).

Cuadro 1: Epidemias y pandemias ocasionadas por el virus de la influenza a lo largo de la historia (1173-2009) (Córdova et al., 2010)

Fecha	Evento
1173	Primer registro de una posible epidemia de influenza
1493	Primer brote de influenza en la isla La Española, probablemente por un virus de tipo porcino transportado en las naves de Cristóbal Colón.
1510	Registro de la primera epidemia de influenza en Europa.
1878	Primer brote de “peste aviar” en Italia.
1889	La influenza rusa, primera pandemia documentada. Se reportó un millón de muertes.
1918	Influenza española, la gran pandemia del siglo XX. Se han estimado más de 50 millones de decesos. Tipo identificado A (H1N1).
Década de los 30’s	Se describe la morfología microscópica del virus y posteriormente los tipos A, B y C.
Década de los 40’s	Se produce la primera vacuna en masa contra la influenza.
1948	Se crea la Red Internacional para el Monitoreo y Control de Influenza, cuya finalidad es identificar nuevas cepas y recordar la composición adecuada de la vacuna.
1957	Se presenta la llamada influenza asiática causada por un nuevo virus tipo A (H2N2), con un estimado de 2 millones de muertes.
1968	Aparición de otra cepa perteneciente al tipo A (H3N2). Se estima un total de un millón de muertes en Hong Kong.
1976	Se reporta un brote de influenza en Fort Dix, New Jersey, E.U.A.
1977	Se reporta la llamada influenza rusa causada por una cepa A (H1N1).
1997	Se aísla en Hong Kong la cepa (H5N1) a partir de una muestra de un niño de tres años; para finales de este mismo año se reportaron un total de 18 casos. El origen de la cepa es aviar.
2009	Aparición en México y Estados Unidos de un nuevo virus de influenza, el virus A (H1N1) triple rearrreglante.

A lo largo de la historia de la humanidad se han presentado diversos brotes epidémicos y pandemias de influenza, considerando a la influenza española como la de mayor impacto, pues originó más de 50 millones de muerte a nivel global. (Córdova et al., 2010)

2.2. Primer caso clínico en México de la pandemia del 2009

El 23 de abril de 2009 se reportó la presencia de un nuevo virus de influenza, descrito como de origen porcino en la mayoría de las muestras enviadas a los laboratorios de Winnipeg, Canadá y Atlanta, EUA, el informe culminaba una intensa búsqueda epidemiológica que se había iniciado casi tres semanas antes, tratando de analizar la ocurrencia de la inusitada frecuencia de neumonías graves en adultos y en jóvenes que se reportaban en el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias en la ciudad de México y simultáneamente en la ciudad de San Luis Potosí, en el centro del país. (Córdova et al., 2010)

En 2009, la infección humana con el virus A (H1N1) se convirtió en una carga para la salud en todo el mundo. Los casos iniciales fueron vistos en el pueblo de La Gloria, en la región costera oriental de México en el estado de Veracruz, casos similares de influenza A (H1N1) se produjeron poco después en otras partes de México como Oaxaca, Ciudad de México y San Luis Potosí. El 23 de abril, varios casos de enfermedad respiratoria grave se confirmaron de origen porcino que consiste en un virus A/H1N1. El 1 de mayo, la Secretaría de Salud de México (MSH) informó que el mayor número de casos de gripe confirmados se encontró en el Distrito Federal (57% del total de casos). (Zepeda, Perea, Miliar, Domínguez, y Xoconostle, 2010)

3. Características generales.

3.1. Estructura viral.

Las partículas virales de la influenza por lo general son esféricas y de 100 nm de diámetro (80 a 120 nm). Los genomas del RNA de cadena sencilla, de sentido negativo de los virus de la influenza A y B poseen ocho segmentos separados, los virus de influenza C contiene 7 segmentos de RNA y carecen de un gen para neuraminidasa. Se conocen el tamaño y las correspondencias codificantes de las proteínas para todos los segmentos. La mayor parte de los segmentos codifica para una sola proteína. Se conoce también la secuencia completa de nucleótidos para muchos virus de la influenza. Los primeros 12 a 13 nucleótidos de cada extremo en cada segmento genómico se conservan entre los ocho segmentos del RNA; estas secuencias son importantes en la transcripción viral. En la figura 1 se muestra la estructura viral: (Tosh, Jacobson y Poland., 2009)

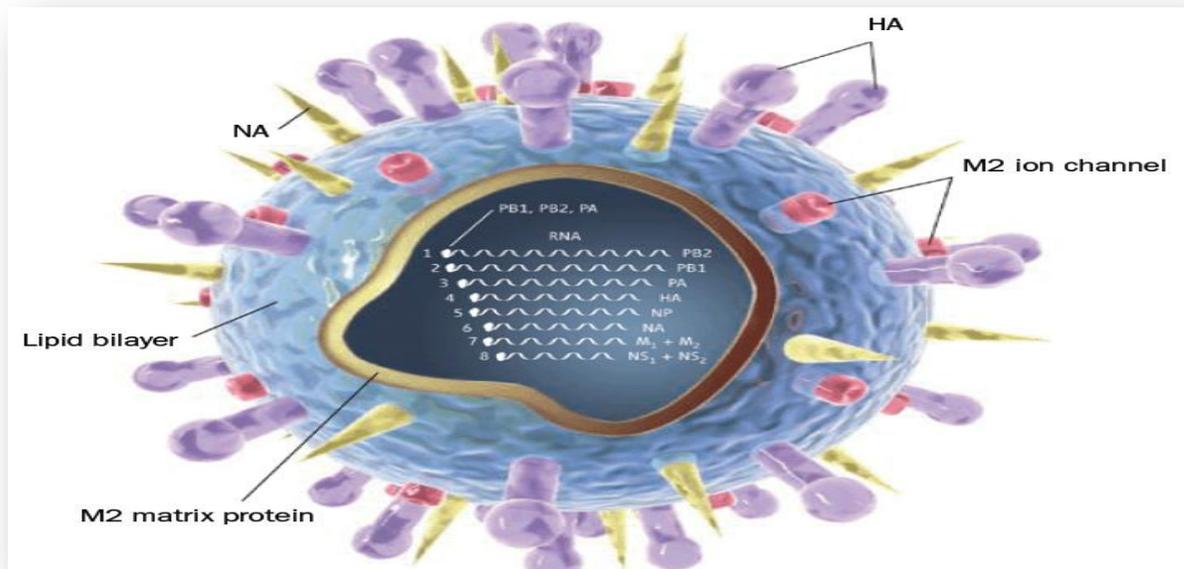


Figura 1: Estructura del virus de influenza. (Tosh et al., 2009)

Las partículas contienen nueve proteínas estructurales diferentes. La nucleoproteína (NP) se reúne con el RNA viral para formar una estructura de ribonucleoproteína (RNP) de 9 nm de

diámetro que asume una configuración helicoidal y forma la nucleocápside viral. Tres grandes proteínas (PB1, PB2 y PA) se unen a la RNP viral y se encargan de la transcripción y replicación del RNA. La proteína de la matriz (M1), que forma una capa por debajo de la envoltura lipídica del virus, es importante en la morfogénesis de la partícula y es un componente principal del virión (casi 40% de la proteína viral).

La partícula viral está rodeada por una envoltura lipídica derivada de las células. Dos glucoproteínas codificadas por el virus, la hemaglutinina (HA) y la neuraminidasa (NA), se introducen en la envoltura y quedan expuestas como espigas de casi 10 nm de longitud sobre la superficie de la partícula. Estas dos glucoproteínas de superficie son los antígenos importantes que determinan la variación antigénica de los virus de la influenza y la inmunidad del hospedero. La HA representa casi 25% de la proteína viral y la NA cerca de 5%. Estas dos proteínas se ilustran en la figura 2. La proteína del canal iónico M2 y la proteína NS2 también se encuentran en la envoltura, pero sólo en unas pocas copias por partícula. (Brooks, Carroll, Butel, Morse y Mietzner, 2008)

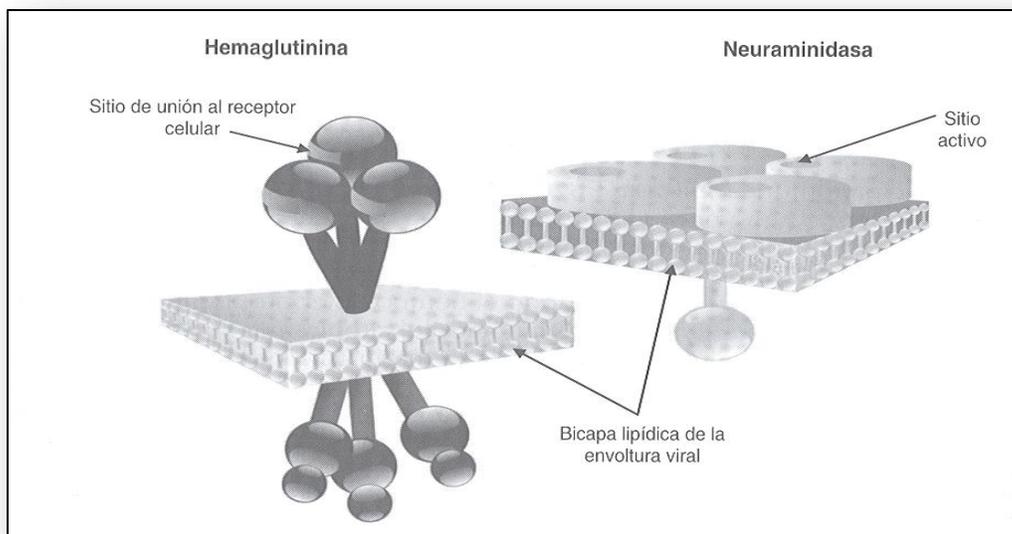


Figura 2: Representación de las glicoproteínas del virus de influenza. La hemaglutinina (HA) como trímero y la neuraminidasa (NA), como tetrámero. (Pérez, Salas, Vazquez y Palomar, 2010)

3.2. Genoma viral.

El genoma del virus está constituido por ocho segmentos de RNA de cadena sencilla de polaridad negativa, con tamaños que van desde 2,350 nucleótidos (el más grande), hasta 890 nucleótidos (el más pequeño), con algunas variaciones dependiendo de la cepa. En total el genoma tiene aproximadamente 13,600 nucleótidos y codifica para once proteínas virales. Todos los segmentos codifican para una proteína, con excepción del gen de PB1 que codifica además por la proteína PB1-F1 en algunas cepas; el gen de la proteína de matriz, que codifica para dos proteínas, M1 y M2 y; el gen más pequeño, el cual codifica por las proteínas NS1 y NS2 (NEP). Todos los genes virales tienen en sus extremos 5' y 3' regiones no traducidas de longitudes variables que contienen las señales de unión para la RNA polimerasa del virus, así como las señales necesarias para la encapsidación del genoma viral. Los últimos 13 y 12 nucleótidos de los extremos 5' y 3', respectivamente, están altamente conservados entre todos los genes del virus. En el cuadro 2 se muestra la composición de segmentos del genoma del virus de influenza A (Córdova et al., 2010)

Cuadro 2: Composición de segmentos del genoma del virus de influenza A de la epidemia H1N1 2009 (Córdova et al., 2010; Clifford, Twigg, y Upton, 2009).

No. De segmento	Nombre del segmento	Tamaño del segmento en nucleótidos	Nombre de la proteína	Función
1	PB2	2277	-Polimerasa básica 2	Reconocimiento del RNA
2	PB1-F2	2271	-Polimerasa básica 1 -Proteína F2	-Adición de nucleótidos. -Proteína apoptótica en la mitocondria del hospedero.
3	PA	2148	Polimerasa ácida	Polimerasa ácida, posible proteasa.
4	HA	1698	Hemaglutinina	Reconocimiento y adherencia al receptor de la célula del hospedero.
5	NP	1494	Nucleoproteína	Proteína asociada al RNA viral.
6	NA	1407	Neuraminidasa	Salida de los nuevos viriones desde la célula del hospedero
7	M	756 291	-M1 -M2	-Proteína de la matriz -Canal de iones

8	NS	690 363 255;501;648	-NS1 -NS2 -NEG8	-Antagonista del IFN- β -Exportación de las ribonucleoproteínas virales del núcleo hacia el citoplasma. -Proteína hipotética -Posiblemente favorece la replicación viral.
---	----	-------------------------------	---------------------------	------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

3.3. Proteínas Virales.

3.3.1. Polimerasa Básica 2 (PB2).

Esta proteína, junto con PB1 y PA, forma un complejo que funciona como la RNA polimerasa viral. Se le ha asociado con la transmisibilidad del virus a través del aire y también con la restricción del hospedero. (Córdova et al., 2010).

3.3.2. Polimerasa Básica 1 y Polimerasa Básica 1 asociada a F2 (PB1 y PB-1-F2)

El gen que codifica por la subunidad PB1 de la polimerasa viral, contiene un segundo marco de lectura abierto que da lugar a la proteína PB1-F2. Esta proteína de 87-89 aminoácido se expresa en la mayoría de las cepas de influenza A (aunque no en todas). Se ha encontrado que esta pequeña proteína se inserta en la membrana de las mitocondrias e induce la muerte celular por apoptosis, de igual manera se ha reportado que exagera la respuesta inflamatoria durante la infección viral primaria en ratones y aumenta la frecuencia y severidad de las neumonías bacterianas secundaria, sin embargo, no se ha descifrado aún el mecanismo a través del cual sucede. Recientemente se reportó que la presencia de ácido aspártico en la posición 66 de PB1-F2 correlaciona con alta patogenicidad de algunas cepas de influenza, a diferencia de aquellas que tienen serina en esta posición. Las cepas pandémicas H1N1-2009 hasta ahora secuenciadas, tienen una serina en la posición 66 de la proteína PB1-F2 (Córdova et al., 2010)

3.3.3. Polimerasa Ácida (PA)

En conjunto con la PB1 y PB2 interactúa con el genoma viral constituyendo el complejo nucleoprotéico y sintetizan nuevos RNA virales actuando como RNA polimerasa.

(Kowalinski, Zubieta y Wolkerstorfer, 2012)

3.3.4. Hemaglutinina (HA)

La proteína HA del virus de la influenza se une a las células epiteliales que recubren la tráquea humana que tienen ácido siálico como receptor. La hemaglutinina es el antígeno principal contra el cual se dirigen los anticuerpos neutralizantes. Es un trímero que es activado por corte, también tiene actividad de fusión bajo pH ácido (Brooks et al., 2008)

3.3.5. Nucleoproteína (NP)

De acuerdo a Jian Luo, Dan Zheng y colaboradores la nucleoproteína NP es un antígeno que se encuentra altamente conservado, ya que la similitud de secuencias de aminoácidos es superior al 90% dentro de un mismo subtipo de virus de influenza, además es el principal antígeno reconocido por las células T citotóxicas después de la infección viral, esta promueve la lisis de células infectadas por el reconocimiento de un péptido NP-MHC, por lo tanto contribuye a la eliminación del virus desde el tejido infectado y previene la propagación de la infección viral (Murray, Rosenthal, Kobayashi y Pfaller, 2003).

3.3.6. Neuraminidasa (NA)

La glucoproteína NA forma un tetrámero y tiene actividad enzimática, ya que escinde el ácido siálico de las glucoproteínas, incluido el receptor celular (Murray et al., 2003).

3.3.7. Proteína de Matriz 1 (M1)

Son específicas de cada tipo y por tanto, se utilizan para distinguir los virus influenza A, B y C. Las proteínas M₁, reviste el interior del virión y estimulan su ensamblado (Murray et al., 2003)

3.3.8. Proteína de Matriz 2 (M2)

La proteína transmembranal M2 es la menos abundante en la superficie del virus. Funciona como canal iónico que permite la entrada de protones al interior de la partícula viral, lo que provoca la disociación de las nucleoproteínas que se encuentran unidas al genoma viral y la liberación de éste para que sea importado al núcleo e inicie su replicación. (Córdova et al., 2010)

3.3.9. Proteína No Estructural 1 (NS1)

La NS1 es una proteína no estructural, nuclear, dimérica, que tiene actividad de unión a RNA de doble cadena y que antagoniza la respuesta de interferón de la célula, a través de prevenir la activación de la proteína cinasa dependiente de RNA (PKR) y la activación de genes por la presencia del RNA de doble cadena. (Córdova et al., 2010)

3.3.10. Proteína No Estructural 2 (NS2)

Proteína en menor cantidad de los viriones, con funciones en la exportación nuclear de RNP viral; de mRNA unido. (Murray et al., 2003)

3.4. Variación antigénica

Los virus de la influenza son notables debido a los frecuentes cambios antigénicos que acontecen en la HA y en la NA. Las variantes antigénicas del virus de la influenza tienen una ventaja selectiva sobre el virus progenitor en presencia de anticuerpos dirigidos contra la cepa original. Este fenómeno origina las características epidemiológicas peculiares de la influenza. Otros agentes que atacan el aparato respiratorio no muestran variación antigénica significativa. (Brooks et al., 2008).

Los dos antígenos de superficie de la influenza son objeto de variación antigénica independiente entre sí. Los cambios antigénicos menores se denominan desviación antigénica, en tanto que las alteraciones antigénicas importantes en la HA y NA, llamadas cambios antigénicos, conducen a la aparición de un nuevo subtipo. El desplazamiento antigénico tiene más probabilidades de producir una epidemia. (Brooks et al., 2008).

3.4.1. Deriva antigénica.

La desviación o deriva antigénica se debe a la acumulación de mutaciones puntuales en el gen, las cuales producen cambios en aminoácidos de la proteína. Los cambios en la secuencia pueden alterar sitios antigénicos sobre la molécula, de modo que un virión puede no ser reconocido por el sistema inmunitario del hospedero. El sistema inmunitario no es el que causa la variación antigénica, pero funciona como una fuerza de selección que permite la expansión de nuevas variantes antigénicas. Una variante debe sufrir dos o más mutaciones antes que surja una nueva cepa epidemiológicamente significativa. (Brooks et al., 2008).

La infidelidad de la replicación del RNA viral resulta en una tasa de mutación del genoma de influenza de aproximadamente un cambio en cada genoma copiado (7.3×10^{-5} mutaciones/nucleótido replicado). En los virus de influenza A las tasas de evolución son diferentes para cada segmento, lo cual probablemente refleja la diferente presión de selección por parte del hospedero para cada proteína. Los genes de la hemaglutinina y la neuraminidasa evolucionan más rápidamente que los otros genes. La tasa de evolución promedio del genoma del virus epidémico A/H1N1-2009 es de 3.66×10^{-3} cambios/nucleótido/año. Este tipo de mutaciones se genera constantemente y en el caso de los genes de las proteínas HA y NA se acumulan hasta llegar a un punto en que el sistema inmunitario de las personas infectadas ya no reconocen las nuevas variantes del virus, o lo hacen más ineficazmente, lo que hace necesario que se revise la composición de la vacuna estacional cada año. En la figura 3 se esquematiza la generación de una nueva cepa de influenza mediante deriva antigénica (Córdova et al., 2010)

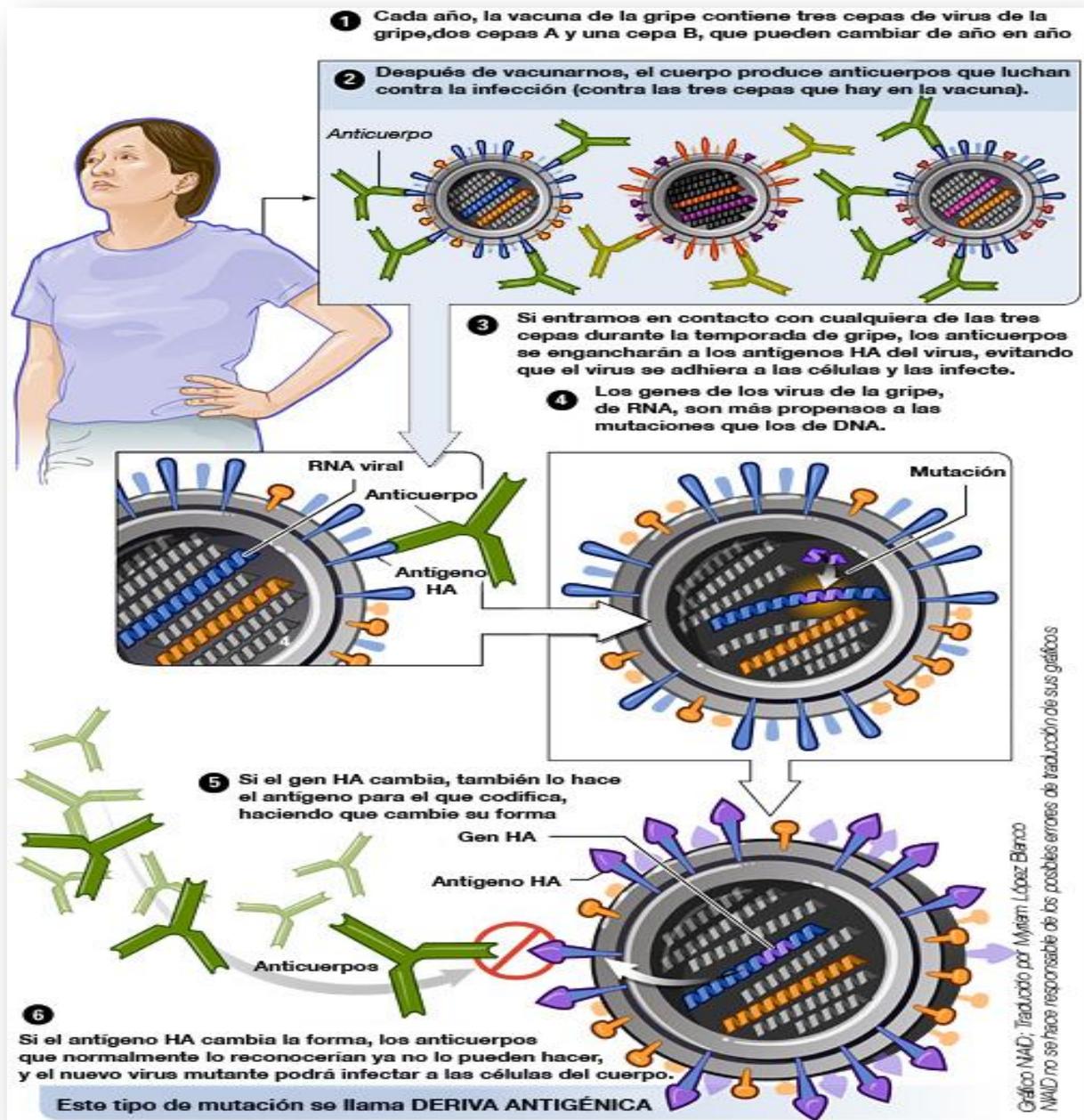


Figura 3: Cómo se genera una nueva cepa de influenza mediante deriva antigénica. Imagen obtenida de National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID, 2012a)

3.4.2. Cambio antigénico.

El cambio antigénico refleja cambios drásticos en la secuencia de una proteína de la superficie viral, cambios demasiado grandes para ser explicados por mutación.

Los genomas segmentados del virus de la influenza se redisponen con facilidad en las células doblemente infectadas. El mecanismo para el cambio es la redistribución genética entre los virus de influenza humanos y los de origen aviar. Los virus de la influenza B y C no muestran cambio antigénico, quizá debido a los pocos virus relacionados con animales. (Brooks et al., 2008)

Este cambio antigénico se ve favorecido por la naturaleza segmentada del genoma del virus. Esta característica facilita que cuando dos subtipos diferentes de virus infecten a un mismo animal, los genes de estos agentes patógenos puedan mezclarse y se produzca una constelación de nuevos virus que portan diversas combinaciones de genes de los virus parentales. Se piensa que este tipo de intercambio de genes entre virus de diferentes especies animales ocurren principalmente en los cerdos ya que, a diferencia de las aves y de los humanos, que generalmente sólo son infectados por virus de influenza A de origen aviar o humano respectivamente (esto es, tiene un tropismo muy específico), los cerdos se infectan al mismo tiempo con dos virus de diferentes especies, por ejemplo de patos y humanos, se convierte literalmente en un recipiente de mezclado de genes, en el cual pueden generarse virus nuevos con fenotipos de patogenicidad difíciles de predecir. Si estos virus, tuvieran proteínas HA y/o NA diferentes a las que circulan en la población y fueran capaces de infectar a humanos y de transmitirse eficientemente de persona a persona, tendrían un alto potencial de causar una pandemia, ya que la población mundial no tendría inmunidad contra ellos. En la figura 4 se muestra como se lleva a cabo el cambio antigénico del virus de influenza. (Córdova et al., 2010)

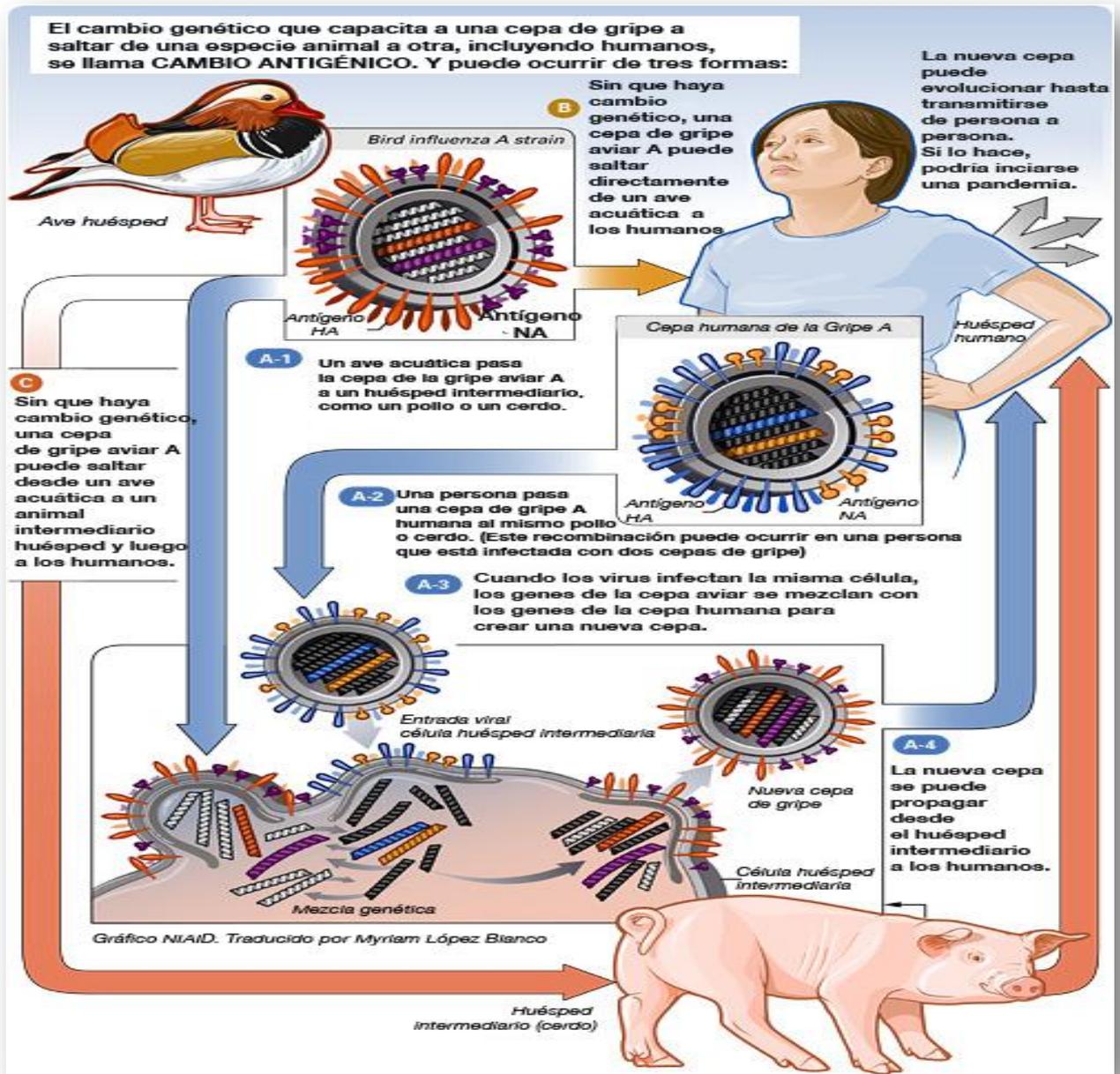


Figura 4: Como se genera una nueva cepa de influenza mediante cambio antigénico. Imagen obtenida de National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID, 2012b)

3.5. Ciclo de replicación.

La replicación viral empieza con la unión de la HA a estructuras específicas de ácido siálico, que son glucoproteínas de la superficie celular, tales se pueden observar en la figura 6, tomando en cuenta que las cepas de virus tipos A y B de gripe humana y de cerdo se unen preferentemente con receptores que contienen residuos terminales de 6'sialil(N-acetil-lactosamina) ($\text{Neu5Ac } \alpha\text{-2-6 Gal}\beta\text{1-4GlcNAc}$) mientras que los virus aviáres y porcino lo hacen escasamente con este oligosacárido y lo realizan preferentemente con 3'-sialilgalactosa ($\text{Neu5Ac } \alpha\text{-2-3 Gal}$), de esta manera se muestra que la especificidad de unión con el receptor de la hemaglutinina es tempranamente alterada después de la transmisión del virus a humanos y cerdos y, por ello, puede ser un requisito previo para una replicación altamente eficaz y la difusión que caracteriza las cepas epidémicas. (Cabezas, 2005)

Aunque ya se mencionó que el ácido siálico es una molécula abundante en todas las células y define el tropismo de los virus de influenza debido a la especificidad que tienen las diferentes cepas del virus por diferentes tipos de enlaces del ácido siálico como por ejemplo los virus aislados de humanos se unen principalmente a ácidos siálicos en unión $\alpha\text{-2,6}$ mientras que los virus aviáres se unen preferentemente a ácidos siálicos con unión $\alpha\text{-2,3}$. En la figura 5 se muestra la estructura química de estos receptores. Las células epiteliales que recubren la tráquea humana tienen principalmente enlaces $\alpha\text{-2,6}$, mientras que las células epiteliales del intestino de aves acuáticas (que es donde se replica el virus en estos animales) tienen el enlace $\alpha\text{-2,3}$, sin olvidar que este tipo de enlace también se encuentran presente en epitelio respiratorio inferior humano. De esta manera se puede explicar los casos de brotes de influenza H5N1 en humanos provenientes de especies aviáres, ya que la prolongada exposición a este virus aviar logra penetrar a epitelio de las vías respiratorias bajas en el cual se encuentra el receptor ($\alpha\text{-2,3}$) y así su replicación y por consiguiente las manifestaciones clínicas de influenza en el humano. (Córdova et al., 2010)

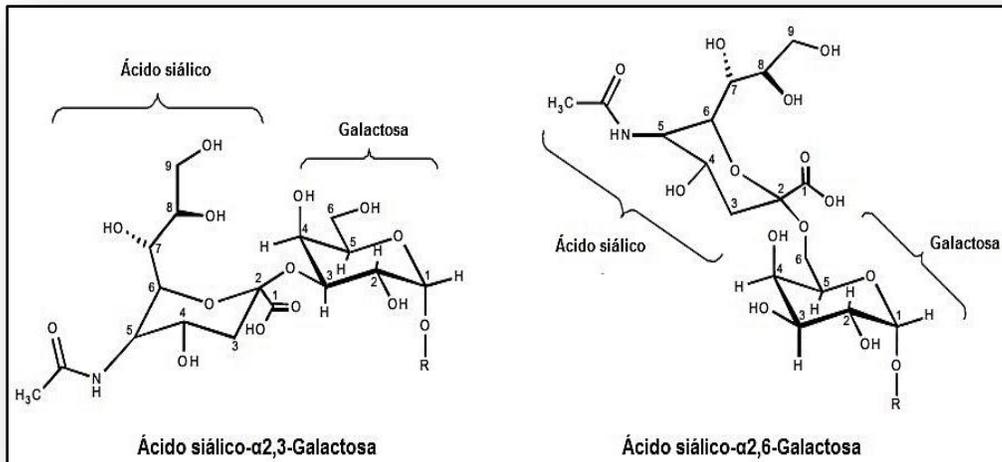


Figura 5: Representación esquemática de las estructuras de ácido siálico (receptores de la hemaglutinina en la célula hospedera) (Córdova et al., 2010)

Una vez uniéndose la hemaglutinina con su receptor celular el virus es internalizado en una vesícula recubierta y se transfiere a un endosoma. La acidificación del endosoma hace HA se doble sobre sí misma y exponga las zonas hidrófobas de la proteína que facilitan la fusión. Entonces la envoltura viral se fusiona con la membrana endosómica. La proteína M2 favorece la acidificación del contenido de la envoltura e interrumpe la interacción entre la proteína M1 y la NP, para permitir la pérdida de envoltura y transmisión de la nucleocápside al citoplasma. La nucleocápside viaja hasta el núcleo donde se transcribe en el RNA mensajero (RNAm) (Murray et al., 2003).

La transcriptasa del virus influenza (PA, PB1, PB2) utiliza el RNAm de la célula hospedera como cebador para la síntesis del RNAm viral; para ello, se apropia de la región del extremo metilado del RNA, secuencia que necesita para una unión eficaz con los ribosomas. Todos los segmentos del genoma se transcriben en RNAm con extremo 5' y un poliadenilo (poli-A) en 3' de cada una de las proteínas individuales, excepto los segmentos de las proteínas M y NS que se conectan de distinta forma (utilizando enzimas celulares) para producir dos RNAm diferentes. Los RNAm se traducen en proteínas en el citoplasma. Las glucoproteínas HA y NA son procesadas en el retículo endoplásmico y el aparato de

Golgi. La proteína M2 se inserta en las membranas celulares, su canal de protones impide la acidificación de Golgi y otras vesículas, evitando así el plegado inducido por el ácido y la inactivación de la HA dentro de la célula. La HA y NA se transportan hacia la superficie celular. (Murray et al., 2003)

Se hace una plantilla para cada segmento de RNA de sentido positivo y en el núcleo se replica el genoma RNA de sentido negativo. Los segmentos del genoma se transportan hacia el citoplasma y se unen a la polimerasa y proteínas NP para formar nucleocápsides que interactúan con la proteína M1 que reviste las secciones de la membrana plasmática que contienen M2, HA y NA. Los segmentos del genoma se envuelven de forma aleatoria, 11 segmentos por virión. Este proceso produce una pequeña de viriones con un genoma completo y numerosas partículas defectuosas (Murray et al., 2003)

El primer paso del ciclo de replicación es la unión al receptor celular por medio de la hemaglutinina (HA), entra por endocitosis (1). Ya adentro de la célula, se forma un endosoma (2), el pH bajo del endosoma es muy importante para la continuación del ciclo, ya que permite la liberación del RNA al citoplasma (3). El RNA entra al núcleo, para que se sintetice el RNAm para las proteínas (4). Una vez formado el RNAm de PB1, PB2 y PA, éste migra a los ribosomas citoplásmicos (5). Lo mismo sucede con los RNAm de M1 y NS1, pero con otra dirección (6). Los RNAm de HA, NA, M2 y NS2 se dirigen a los ribosomas del retículo endoplásmico (RE) (7). Las proteínas PB, PA, PB2 y NP regresan al núcleo (8 y 9). Se sintetiza el RNA genómico segmentado de polaridad negativa (10); enseguida el genoma emigra hacia el citoplasma para ser ensamblado (11). Las proteínas HA y NA, después de pasar por el aparato de Golgi, migran a la membrana citoplásmica (12). Finalmente la partícula completa es liberada, con ayuda de la neuraminidasa (NA) que remueve los residuos de ácido siálico, en la figura 6 se muestra el mecanismo de replicación. (Pérez et al., 2010)

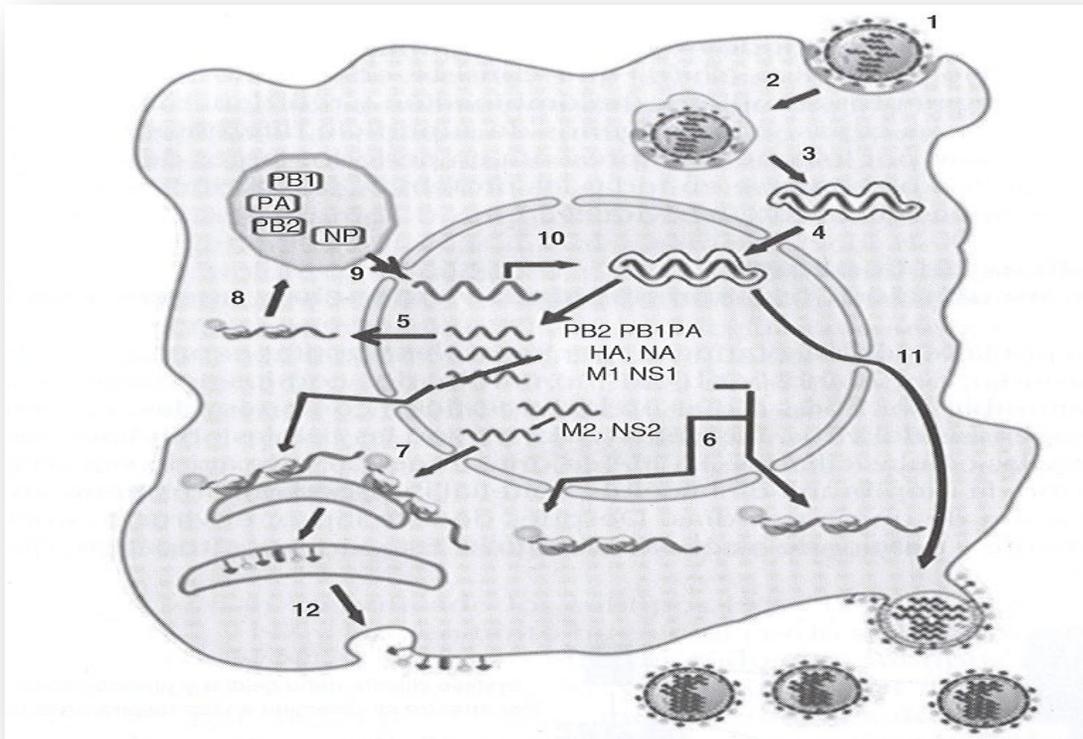


Figura 6: Representación del ciclo de replicación del virus de influenza. (Pérez et al., 2010)

3.6. Respuesta inmune.

Los virus son microorganismos intracelulares obligados que se replican en el interior de las células, usando a menudo los ácidos nucleicos y la maquinaria de síntesis proteínica del hospedero. La mayoría de los virus infectan a una amplia variedad de poblaciones celulares mediante la utilización de moléculas de superficie normales de las células como receptores para penetrar en ellas. (Abbas y Lichtman, 2004)

La replicación vírica interfiere en la síntesis y la función proteínica normal, lo que origina una lesión y, en último término, la muerte de la célula infectada. Las respuestas inmunitarias innatas y adaptativas frente a los virus tienen como objetivo bloquear la infección y eliminar las células infectadas (Brooks et al., 2008).

La respuesta inmune frente a la influenza es duradera y específica de subtipo. Los anticuerpos contra la HA y la NA son importantes en la inmunidad a la influenza, en tanto que los anticuerpos a otras proteínas codificadas por el virus no son protectores. La resistencia al desarrollo de la infección se relaciona con los anticuerpos contra la HA, en tanto que la menor gravedad de la enfermedad y la menor capacidad para transmitir el virus a los contactos se relaciona con los anticuerpos dirigidos contra la NA. Los anticuerpos contra la ribonucleoproteína son específicos de tipo y útiles para tipificar los virus aislados (como influenza A o B). (Brooks et al., 2008).

En la figura 7 se esquematiza la inducción de la respuesta inmune después de una infección primaria por influenza A la cual se indica mediante flechas sólidas. La activación más rápida de poblaciones celulares de memoria por virus específicos después de un encuentro secundario con el virus de influenza A esta indicado por las flechas punteadas. (Van de Sandt, Joost y Rimmelzwaan 2012)

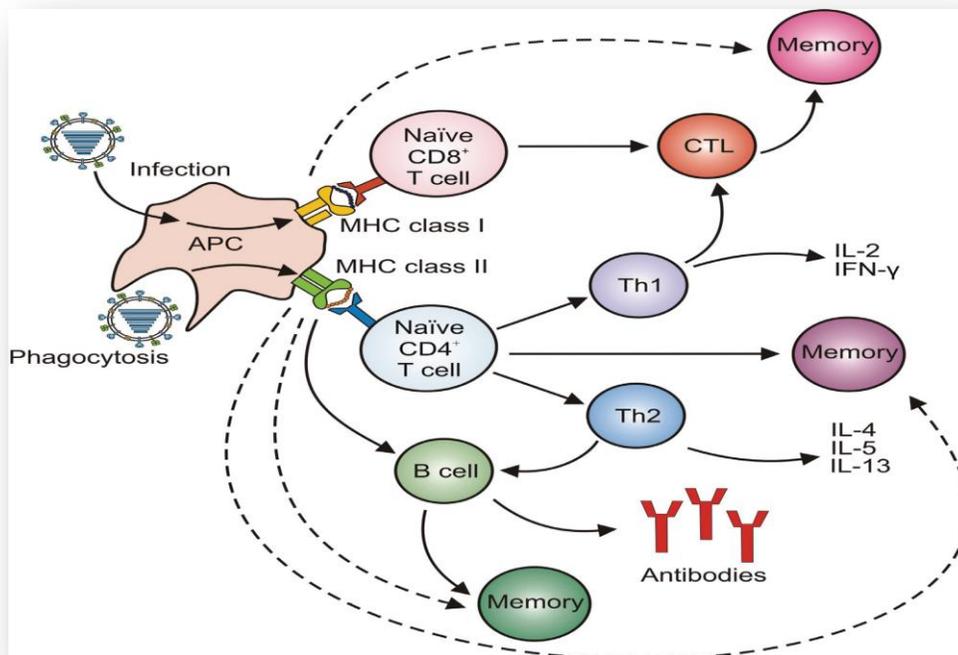


Figura 7: Representación esquemática de la inducción de la inmunidad celular y humoral.
(Van de Sandt et al., 2012)

Los tres tipos de virus de influenza guardan interrelación antigénica lo cual no induce una protección cruzada, cuando hay una desviación antigénica, una persona con anticuerpos previos de la cepa original puede presentar una infección leve con la nueva cepa, esto se debe a que se cree que la función de la respuesta inmunitaria mediada por células en la influenza es contrarrestar una infección establecida; donde las células citotóxicas T producen lisis de células infectadas. La respuesta de los linfocitos T citotóxicos es una reacción cruzada (capaz de producir lisis en las células infectadas con cualquier subtipo de virus) y parece estar dirigida de manera predominante contra las proteínas internas (NP, M) y las glicoproteínas de la superficie (Brooks et al, 2008).

4. Diagnóstico clínico

4.1. Métodos de diagnóstico en el laboratorio.

Los métodos de detección de los virus se basan en detectar su morfología, ácido nucleico o algunas de sus proteínas. Debido a que los animales reaccionan a la infección viral, produciendo anticuerpos neutralizantes de los virus, y a que la presencia de anticuerpos en la sangre de los animales infectados suele permanecer largo tiempo después de la infección, para detectar infecciones recientes puede emplearse la presencia de anticuerpos específicos antiviral como indicación de una posible infección, es decir, serología (Coll, 1993).

La morfología sólo es posible apreciarla al microscopio electrónico, a partir de muestras infectadas, cultivos celulares que han amplificado el número de virus o concentrados de virus. En cuanto a la detección del ácido nucleico del virus se basan en el reconocimiento específico por hibridación de las secuencias virales por medio de ácidos nucleicos complementarios fabricados en el laboratorio, las sondas y por amplificación de su material genético, PCR ó RT-PCR (Coll, 1993).

Las pruebas de laboratorio pueden distinguir el virus influenza de otros virus respiratorios e identificar subtipo y cepa. En el cuadro 3 se muestran algunos ejemplos de pruebas diagnósticas para influenza (Murray et al., 2003)

Cuadro 3: Métodos de diagnóstico para influenza por laboratorio. (Córdova et al., 2010)

Método	Tipo de influenza que detecta	Ventajas	Desventajas	Tiempo
Aislamiento viral (cultivo celular)	A y B	Sensible y específico. Puede detectar otros virus respiratorios. Estándar de oro. Es vital para la vigilancia virológica y la formulación de vacunas. En células	Técnicamente muy laborioso. Depende del transporte y calidad de la muestra así como contar con un laboratorio con la tecnología para cultivo celular. Los resultados no están disponibles en tiempos clínicamente relevantes.	5 días en promedio
Detección de ácidos nucleicos (RT-PCR)	A, B y C	Altamente sensible y específico. Resultados el mismo día. Permite tipificar y subtipificar. Puede detectar virus que no se aíslan en cultivo y a múltiples virus respiratorios. Es una técnica de <u>biología molecular</u> , sirve para amplificar un fragmento de ADN; su utilidad es que tras la amplificación resulta mucho más fácil identificar con una muy alta probabilidad, <u>virus</u> o <u>bacterias</u> causantes de una <u>enfermedad</u> , se fundamenta en la propiedad natural de los <u>ADN polimerasas</u> para replicar hebras de ADN, para lo cual se emplean ciclos de altas y bajas <u>temperaturas</u> alternadas	Puede no identificar nuevas cepas circulantes o pandémicas.	<1 día

		para separar las hebras de ADN recién formadas entre sí tras cada fase de <u>replicación</u> y, a continuación, dejar que vuelvan a unirse las hebras de ADN para que vuelvan a duplicarse.		
Inmunofluorescencia	A y B	Específico y rápido. Una misma muestra puede evaluarse para múltiples patógenos. Se puede realizar a partir de cultivo o directamente de la muestra clínica. Esta prueba se basa en la unión covalente de anticuerpos a colorantes fluorescente para permitir su fácil observación. (El color de los anticuerpos está determinado por el tipo de colorante que se utiliza), los anticuerpos fluorescentes pueden emplearse para detectar la presencia de antígenos o anticuerpos en el interior de los tejidos o sobre las células. Puede ser directa en la cual el anticuerpo se une al antígeno objeto de estudio y se hace visibles bajo luz ultravioleta o indirecta, diseñada para detectar anticuerpos mediante la unión de un anti-anticuerpo.	Relativamente complejo. Requiere personal experimentado. Depende en gran medida de la calidad de la muestra.	Aprox. 4 horas

<p>Pruebas rápidas (RIDT) (prueba rápida de diagnóstico de influenza)</p>	<p>A y/o B</p>	<p>Específico. Simple y rápido. Esta prueba es un inmunoensayo que puede detectar la influenza A y B y permite un tratamiento efectivo y quimioprofilaxis. Los resultados positivos son útiles para vigilancia de influenza estacional. Los médicos clínicos deben conocer que las susceptibilidades de las pruebas de diagnóstico rápido de la influenza (RIDT) y los ensayos de inmunofluorescencia directa (DFA) son menores que las de las pruebas de reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (rRT-PCR) en tiempo real y el cultivo viral. A resultado negativo de la RIDT o DFA no descarta la posibilidad de infección por el virus de la influenza. Además, estas pruebas no pueden distinguir entre los virus de la influenza H1N1 2009 y la influenza de temporada H1N1 o virus de la influenza A H3N2. Las pruebas de diagnóstico rápido de la influenza (RIDTs) son pruebas inmunes de detección del antígeno nucleoproteico viral de la</p>	<p>Sensibilidad y Valores predictivos positivos bajos. Los resultados negativos requieren confirmación. No hay manera de monitorear la calidad de la muestra.</p>	<p>30 a 60 minutos</p>
---------------------------------------------------------------------------	----------------	-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	------------------------

		<p>influenza. Las pruebas rápidas comercialmente disponibles, pueden arrojar resultados en 30 minutos o menos por ejemplo: QuickVue Influenza A + B</p>		
<p>Serología (IHA, MN, fijación de complemento)</p>	<p>A, B y C</p>	<p>Puede detectar infecciones que resultaron negativas al aislamiento. Muy útil como herramienta de investigación y vigilancia epidemiológica. Hay seis tipos de pruebas serológicas; precipitación, aglutinación fijación de complemento, inmunofluorescencia, radioinmunoensayo y enzimoimmunoanálisis (ELISA).</p> <p>Las reacciones inmunes que defienden el organismo frente a la infección pueden utilizarse para el diagnóstico de muchas enfermedades ya que la serología es una de las ramas de la inmunología que aplica las interacciones antígeno-anticuerpo, generalmente, identifican aquellos agentes desconocidos presentes en las muestras clínicas la puesta en contacto de la muestra con un reactivo que contiene concentraciones conocidas de antígenos o anticuerpos.</p>	<p>Sensibilidad y especificidad variables. Diagnóstico meramente retrospectivo. Requiere muestras pareadas. Tiene limitada utilidad clínica.</p>	<p>2 a 4 semanas</p>

Microscopia electrónica (Tinción negativa)	A, B y C	<p>Rapidez en situaciones de emergencia. Sólo se requiere una muestra y se puede tomar directamente del paciente. Se puede relacionar con la enfermedad cuando se conoce el origen de la muestra. La microscopia electrónica usa electrones en lugar de luz</p> <p>Con este instrumento se puede observar la morfología de los viriones presentes en las muestras clínicas.</p> <p>La limitación de este método, además del costo del microscopio, es que necesita una concentración elevada de viriones (aproximadamente 10⁹ partículas virales por mL, dependiendo del virus) en la muestra, por lo tanto decimos que es poco sensible</p>	<p>No discrimina entre los diferentes tipos. Requiere personal muy experimentado. Requiere inversión inicial en equipo e infraestructura.</p>	Aprox. 1 hora
--------------------------------------------	----------	---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	---------------

Nota: RT-PCR, reacción en cadena de la polimerasa en transcripción reversa; IHA, inhibición de hemaglutinación; MN, microneutralización.

En el cuadro 3 se pueden observar diferentes tipos de métodos de diagnóstico para la influenza. Aunque estos métodos difieren en cuanto a su fundamento el objetivo es el mismo, localizar una parte o todo el antígeno y material genético como también moléculas de respuesta de los hospederos entre las cuales se encuentran interleucinas, factores de transcripción, anticuerpos, y otras proteínas conocidos como biomarcadores. Estas pruebas han hecho innecesaria la detección directa del microorganismo patógeno. Los avances en biología molecular y el desarrollo de la tecnología robótica, secuenciación genómica y proteínica han permitido el desarrollo de nuevas pruebas diagnósticas altamente específicas

y de gran rendimiento. La genómica y proteómica contribuyen a la identificación de biomarcadores. (Hernández y Rodríguez 2009)

4.2. Aislamiento viral.

Los virus de influenza se obtienen de secreciones respiratorias, Aunque no se recomienda, también es posible realizar aislamientos a partir de esputo en caso de presentarse. generalmente el virus se aísla en cultivos primarios de riñón de mono o en la línea celular de riñón canino Madin-Darby, en donde se puede detectar el efecto citopático inespecífico a los 2 días (media 4 días), (Murray et al., 2003)

El método tradicional para recuperar virus de influenza es el ya antes mencionado, ya que este constituye un método muy sensible, y permite obtener cepas nuevas o diferentes a las cepas estacionales tradicionales. Además el cultivo celular proporciona aislamientos para la caracterización y su consideración subsiguiente como cepas vacunales, también permite la recuperación simultánea de otros virus respiratorios si se utilizan las líneas celulares adecuadas. (Murray et al., 2003)

La replicación del virus en cultivos celulares se detecta observando el efecto citopático, por lo general está reportado en la literatura entre un intervalo de 3 a 14 días sobre células MDCK. También existen técnicas de cultivo más rápidas que detectan la replicación del virus de influenza usando anticuerpos monoclonales entre uno y tres días (antes de que las células se desprendan de la monocapa como efecto citopático), aunque considerando como desventaja el que presenta una sensibilidad muy variable, entre 56 a 100% comparado con los cultivos celulares convencionales. (Córdova et al., 2010)

El aislamiento viral en cavidades amnióticas y alantoideas de huevos embrionados (10-11 días), es un método muy laborioso y poco realizado por los laboratorios de diagnóstico. Sin embargo, cuando es desarrollado por laboratorios de referencia, produce altos títulos virales y es esencial para la producción de vacunas. (Córdova et al., 2010)

El aislamiento viral también conocido como método de referencia, también llamado “estándar de oro” para el diagnóstico del virus de influenza que por definición tiene una sensibilidad y especificidad de 100%. Se debe recordar que el aislamiento viral sólo detecta la presencia de la partícula viral completa e infectiva, así que aquellas muestras que se

transportaron indebidamente o fueron mal almacenadas, pueden producir resultados de aislamiento viral malos y la tipificación puede estar disponible entre cinco a siete días, de tal manera se deduce actualmente que los métodos moleculares que pueden detectar material genético, aun en presencia de bajas cargas virales y poca actividad infectante, pueden considerarse altamente sensibles, incluso más que el propio cultivo viral.(Córdova et al., 2010).

4.3. Prueba de hemaglutinación.

Los virus influenza tienen su superficie cubierta de espículas formadas por la proteína hemaglutinina HA, que tienen la propiedad de aglutinar diferentes eritrocitos o glóbulos rojos (pollo, ganso, curiel, humanos del grupo “O”, carnero, etc.), derivando su nombre de esta característica. (Wiedbrauk y Johnston 1993).

La prueba de hemaglutinación es uno de los métodos indirecto más comunes para cuantificar partículas virales en suspensión, sin embargo no es una medida de infectividad, este ensayo se basa en la capacidad de algunos virus para agregar varias especies de glóbulos rojos. Este efecto ocurre por la interacción de glicoproteínas virales (hemaglutininas), con los receptores de superficie en la membrana de glóbulos rojos. No todos los virus son capaces de causar esta reacción y otros solo pueden reaccionar con glóbulos rojos de especies particulares bajo condiciones de pH y fuerza iónica, esta característica se encuentra representada en la figura 8 (Wiedbrauk y Johnston 1993).

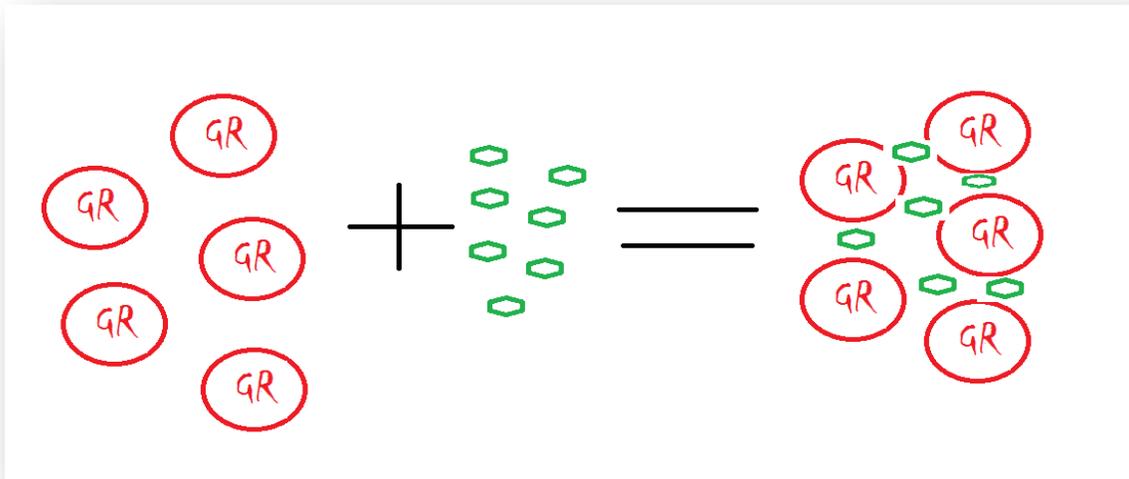


Figura 8: Representación esquemática de hemaglutinación entre eritrocitos humanos tipo O y virus de influenza formando esquemáticamente una red.

La prueba de IHA como se muestra en la figura 10 puede utilizarse para identificar los anticuerpos de los pacientes contra el virus de influenza, cuando se cuenta con antígenos de influenza como material de referencia. Se considera que una prueba de IHA es positiva para este virus, cuando los sueros pareados de fase aguda y convalecencia, muestran un incremento en el título de anticuerpos de al menos cuatro veces. (Murray et al., 2007).

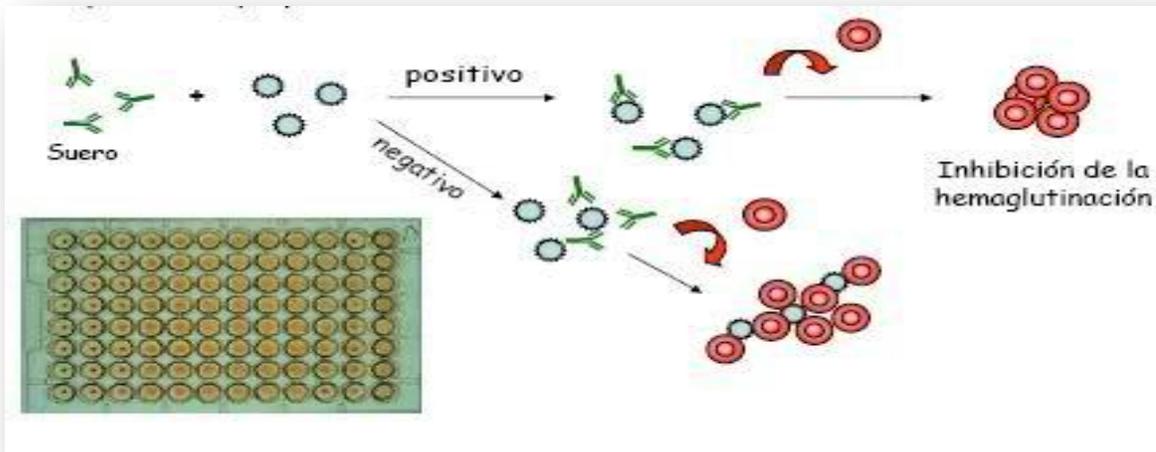


Figura 9. Representación esquemática de la prueba de IHA

5. Cultivo celular.

Los cultivos celulares han permitido un notable avance en el estudio de la célula y sus características. (Contreras, Silva y Hopkins. 2009)

El cultivo celular es un conjunto de técnicas que permiten el mantenimiento de las células in vitro, conservando al máximo sus propiedades fisiológicas, bioquímicas y genéticas, ya que se pueden controlar todos los factores del medio: físico-químicos (pH, temperatura, niveles de O₂, CO₂), y fisiológicos (factores de crecimiento, densidad celular), mediante un medio definido que tiene las necesidades nutritivas de las células en cuestión y que se suplementan con soluciones complejas como suero en los que se encuentran los factores nutritivos imprescindibles para el mantenimiento del cultivo. Las células en cultivo de una línea celular (propagación), se pueden obtener con facilidad un número elevado de réplicas idénticas (Wiedbrauk y Johnston, 1993).

Las células primarias son células aisladas que derivan directamente de los tejidos. La fuente de tejido para la mayoría de los cultivos de células primarias es ya sea de animales de laboratorio o muestras patológicas de humanos. Investigaciones en instituciones deberían contar con un proceso de revisión y aprobación para la adquisición de animales de laboratorio y tejidos humanos (biótica). Cuando un proyecto de utilización de animales de laboratorio, y tejido humano en particular, se está desarrollando este proceso de aprobación debe ser seguido de forma explícita. (Wiedbrauk y Johnston, 1993).

Mientras que las líneas celulares crecen continuamente en subcultivos a diferencia de las células primarias. La mayoría de las líneas celulares pueden ser propagadas en una forma inalterada para un número limitado de generaciones de células, más allá de la cual ya sea morir o mantenerse como líneas celulares continuas. La capacidad de una línea de células de crecer continuamente probablemente refleja su capacidad de variación genética, que permite la selección posterior (Wiedbrauk y Johnston, 1993).

5.1. Línea celular MDCK.

Es una línea celular que proviene del Riñón canino de una hembra adulta aparentemente normal *cocker spaniel*, que se aisló por primera vez en septiembre de 1958 por S. H. Madin y N. B. Darby.

Estas células presentan morfología epitelial típica y son positivas a la tinción para queratinas. Son susceptibles, con base en el catálogo de la ATCC, a los virus de la influenza A, hepatitis B, Reovirus 2 y 3, virus de la estomatitis vesicular, adenovirus y virus vaccinia (ATCC, 2012a).

5.3. Hep-2

Las células Hep-2 son epiteliales humanas que provienen de la línea celular HeLa (línea celular que proviene de una muestra de cáncer cérvico-uterino obtenida el 8 de febrero de 1951 de una paciente llamada Henrietta Lacks) contienen cromosomas marcadores, y se obtuvieron a través de la contaminación HeLa. Esta línea se pensó originalmente que se deriva de un carcinoma epidermoide de laringe, pero posteriormente se encontró, basándose en el análisis de isoenzimas, cromosomas marcadores HeLa, y huellas de ADN, que se han establecido a través de contaminación de células HeLa. Las células son positivas para la queratina mediante tinción con inmunoperoxidasa (ATCC, 2013)

El medio de base para esta línea celular es ATCC-formulado Medio Esencial Mínimo de Eagle. Para hacer que el medio de crecimiento completo, se le añaden los siguientes componentes a la base de soporte: suero fetal bovino a una concentración final de 10%.
Atmósfera: aire, 95%; dióxido de carbono (CO₂), 5% Temperatura: 37,0 ° C

5.2. Línea celular A549.

Es una línea celular continua adherente de adenocarcinoma pulmonar humano, clasificadas comúnmente como células epiteliales escamosas del epitelio alveolar basal, responsable de la difusión de sustancias como el agua y los electrolitos, a través de los alvéolos de los

pulmones. Se aislaron por primera vez en 1972 por Giard, D.J. a través de la extracción y cultivo de tejido pulmonar carcinomatoso explantado de un varón caucásico de 58 años. Es una línea de células humanas hipotriploide con el número cromosómico modal de 66, que se producen en un 24 por ciento de las células (ATCC, 2012b).

Las células A549 deben ser cultivadas en medio esencial mínimo de Eagle modificado de Dulbecco suplementado con 10% de SFB. Pueden ser cultivadas en forma adherente o en suspensión y, en ambos casos crecen con facilidad; el recuento de células se duplicará aproximadamente cada 24 horas (Wiedbrauk y Johnston, 1993).

6. Proteómica.

6.1. ¿Qué es la proteómica?

Se puede definir proteómica como el estudio de las propiedades de las proteínas a nivel de expresión, modificaciones post-traduccionales, interacciones proteicas, etc., a gran escala, en comparación a otros ensayos con la proteómica se puede observar la expresión de los genes a nivel de las proteínas funcionales, con lo que se hace posible obtener una visión global e integrada de los procesos celulares, redes metabólicas y procesos patogénicos a nivel de las proteínas presentes en las células de los tejidos (Virgili y Vidal, 2006)

6.2. Análisis proteómico.

Para poder realizar estudios de proteómica es necesario utilizar diferentes metodologías proteicas que secuencialmente son:

- Purificación de las proteínas del tejido y/o células.
- Separación de las proteínas
- Identificación de una proteína

En consecuencia para poder obtener proteínas de un tejido hay que disgregarlo mecánicamente o enzimáticamente para poder acceder a las células y poder lisarlas, el lisado celular se realiza con detergentes que desestabilizan las membranas celulares liberando el contenido celular. Para evitar la degradación se debe introducir en la solución de lisis inhibidores de proteasas, y una vez lisado se prosigue a la desalación ya que puede interferir en la separación de proteínas. (Virgili y Vidal, 2006).

La separación por tamaño molecular se realiza mediante una Electroforesis en Gel de PoliAcrilamida con el detergente aniónico Dodecil-Sulfato de Sodio (SDS-PAGE). En este método las proteínas migran hacia el ánodo al estar cargadas negativamente debido al SDS y se separan en función a su peso o tamaño molecular, para revelar la posición de las proteínas hay que teñir generalmente con azul de Coomassie. (Virgili y Vidal, 2006)

Sin embargo para llevar a cabo un análisis proteómico es necesario utilizar otras técnicas basadas en otras características diferentes del tamaño molecular de las proteínas para ampliar la resolución de la separación del contenido proteico en las células. Como primera etapa se realiza otra técnica electroforética que se basa en otra característica de la estructura primaria de las proteínas; esta es la carga eléctrica que presentan las proteínas por la presencia de aminoácidos cargados positiva o negativamente en su secuencia. Utilizando la carga de las proteínas se pueden separar por electroforesis dentro de un gel que presente un gradiente de pH entre el cátodo y el ánodo, técnica conocida como isoelectroenfoque, esto se muestra en la figura 10. (Virgili y Vidal, 2006)

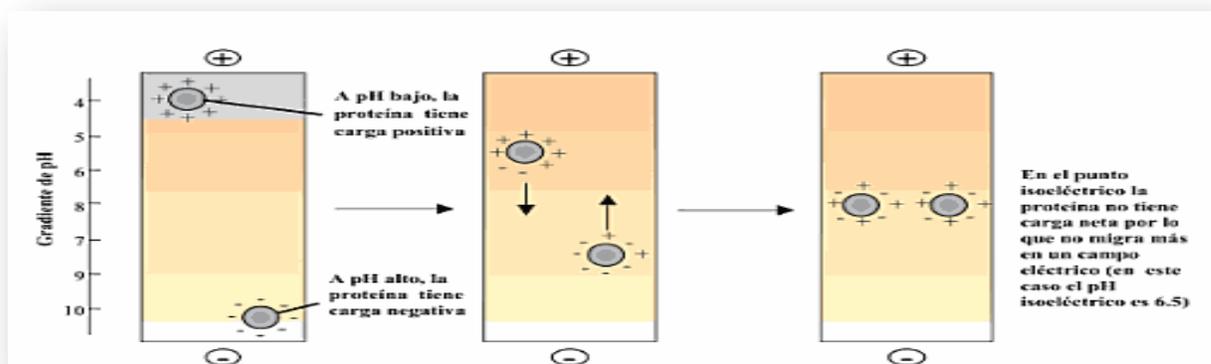


Figura 10: Representación esquemática del principio de isoelectroenfoque (Virgili y Vidal, 2006)

Una vez realizada la separación de proteínas por Isoelectroenfoque y SDS-PAGE de forma consecutiva se observan una mejor resolución de la separación de proteínas celulares. A este proceso se le conoce como electroforesis de dos dimensiones ó bidimensional. La primera dimensión basada en la carga de las proteínas y la segunda dimensión en el tamaño molecular de estas, de esta manera es posible separar dos proteínas que tengan el mismo o muy parecido tamaño molecular en regiones diferentes de un gel y poder visualizarlas independientemente como se puede ver en la figura 11:

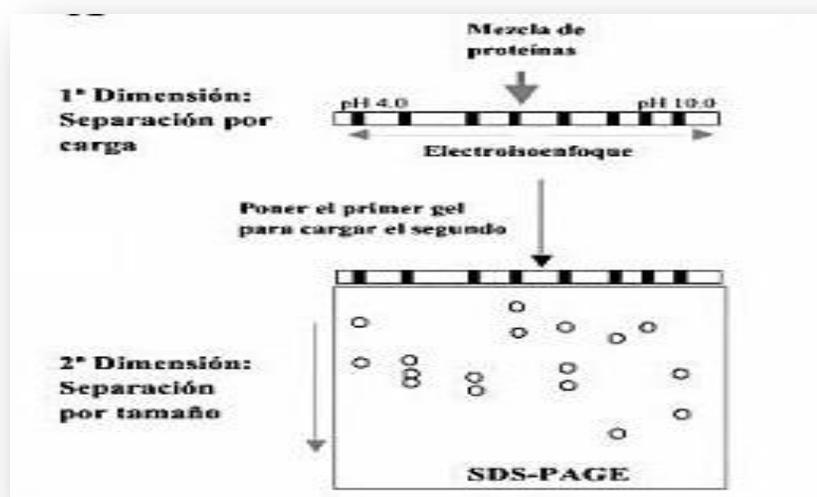


Figura 11: Representación esquemática del proceso de separación por geles bidimensionales.

(Virgili y Vidal, 2006)

Una vez realizada la electroforesis bidimensional es complicado identificar una proteína determinada, sobre todo si esta en regiones cercanas de otras proteínas por lo que es necesario complementar el estudio proteómico con otras herramientas que identifiquen individualmente a las proteínas como espectrometría de masas por MALDI-TOF, el cual se basa en aislar la proteína o los péptidos mezclados en un ácido orgánico y secado sobre una placa cerámica o de metal (matriz) en la cual se impacta un láser sobre la muestra haciendo saltar el péptido de la placa en forma de gas ionizado con 1-2 cargas positivas. El péptido ionizado es acelerado en un campo eléctrico hacia un detector. El tiempo que tarda en llegar

al detector está determinado por su masa y su carga: los péptidos largos se mueven más despacio y las moléculas con más cargas más rápido. (Virgili y Vidal, 2006)

El interés de un estudio proteómico sobre líneas celulares infectadas con virus de influenza se debe a que se ha descrito anteriormente que durante el curso de infección viral, las proteínas virales interactúan con las vías y formación de proteínas de hospedero y pueden modificarse. (Shapira, Viks, Shum, Dricot, M. de Grace, Wu, Gupta, Hao, Silver, Root, Hill, Regev, y Hacohen 2009)

7. Objetivos.

7.1. Objetivo general.

Estandarizar los métodos de infección por los virus de Influenza A H1N1/A/México/4482/2009 y A/PR/8/34 en cultivo de líneas celulares epiteliales MDCK, Hep-2 y A549 e identificar las alteraciones morfológicas provocadas por dicha infección. Asimismo, estandarizar los procedimientos de extracción de proteínas para su ulterior estudio por medio de análisis proteómico.

7.2. Objetivos particulares.

- Realizar cultivo de líneas celulares epiteliales MDCK, A549 y HEP-2 e infectarlas con influenza A.
- Identificar la infección viral mediante ensayos de hemaglutinación e inmunofluorescencia y observar las alteraciones morfológicas mediante microscopía óptica.
- Establecer métodos de extracción y cuantificación de proteínas para realizar electroforesis unidimensional y bidimensional para su posterior análisis proteómico.

8. Hipótesis.

Si se infectan líneas celulares epiteliales MDCK, Hep-2 y A549 con influenza A, éstas verán alterada su morfología debido al proceso de propagación viral a diferentes tiempos post-infección lo que ocasionará diferentes títulos virales. Asimismo se comprobará la infección mediante ensayos de hemaglutinación y/o inmunofluorescencia.

Si se realiza un lisado celular adecuado, la integridad proteínica podrá observarse mediante electroforesis unidimensional, asimismo, si se aplica el correcto tratamiento a las muestras proteínicas se podrán conocer los parámetros para la realización de geles bidimensionales en ulteriores estudios proteómicos.

9. Material y métodos.

Las líneas epiteliales MDCK, Hep-2 y A549 son descongeladas mediante el método 2 que se describe en el anexo apartado 8 y cultivadas en medio esencial mínimo de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) con un 10% de suero fetal bovino en frascos T de cultivo de 75 cm² (Corning®) con cambio de medio cada 48 horas. Se propagaron y congelaron cuando alcanzaron del 95 al 100% de confluencia. Para la congelación y propagación celular se realizó el método acotado en la sección anexa 6 y 7 respectivamente. Se cuantificaron las células como se describe en el anexo 8 y se sembraron un millón de células por cada frasco T de cultivo de 75 cm² (Corning®). Se usaron los subtipos del virus de influenza A/PR/8/34 y pandémico 2009 A/H1N1, adaptados para cultivo celular, para infectar las líneas celulares MDCK, Hep-2 y A549.

Se infectaron la línea celular MDCK con una Multiplicidad de infección (MOI) de 0.1 para propagar ambos virus como se describe en el anexo 10 y se realizó una titulación por el método de hemaglutinación descrito en la sección anexa 9 para conocer la cantidad de viriones en las muestras.

Se infectaron líneas celulares MDCK, Hep-2 y A549 como se describe en el anexo 10.

Para corroborar la infección de la línea celular MDCK y Hep-2 se realizó una titulación por ensayo de hemaglutinación a los tiempos 6, 12 y 24 y 24, 48 y 72 horas post-infección,

respectivamente y se comprobó la infección en células A549 mediante inmunofluorescencia, técnica descrita en el anexo 18.

Las células infectadas son lisadas químicamente con una solución de lisis amortiguadora de Tritón X-100 al 0.1% a la que se le agrega un coctel de inhibidor de proteasas (Sigma®) de acuerdo al anexo 11. También fueron sometidas a una lisis física (congelación-descongelación alternadas para asegurar la completa extracción de proteínas) como se describe en el anexo 11. Los lisados son centrifugados a 13000 rpm por 15 min a 4° C para eliminar cualquier célula remante y detrito celular. La muestras control, es decir, las células no infectadas, son procesadas y analizadas en la misma forma que las infectadas por el virus de la influenza A (H1N1). A partir de esta etapa se puede trabajar en condiciones normales de bioseguridad, ya que el virus se encuentra inactivo.

A continuación se realizó la cuantificación proteica de los lisados celulares mediante la técnica de BCA (ácido bicinconínico Thermo Scientific®), descrita en el anexo 12.

Las muestras fueron sometidas a una electroforesis en gel de poliacrilamida SDS-PAGE para corroborar la integridad proteínica como se indica en el anexo 14. Y se establecieron las condiciones óptimas para la realización de geles bidimensionales.

Como ulteriores estudios las muestras serán sometidas sistemáticamente (al menos 3 geles por tipo de muestra), a una separación electroforética en dos dimensiones, de modo que se tendrá una muestra estadísticamente significativa de las proteínas sobreexpresadas consistentemente durante el proceso infeccioso. Las muestras serán inicialmente cargadas en tiras para isoelectroenfoque ReadyStrip IPG con un gradiente de pH no lineal, y dejadas en una solución de rehidratación durante 14-16 horas. La primera etapa de la separación electroforética se llevará a cabo en una cámara para isoelectroenfoque (IEF Cell). Para la segunda etapa (SDS-PAGE)(Link, 1999) se usan geles de acrilamida (12%) en una cámara para electroforesis. Las proteínas son visualizadas con tinción coloidal (azul de Coomassie o tinción de plata) compatible con ulteriores análisis proteómicos. El análisis diferencial de los geles bidimensionales se llevará a cabo con el programa PD-Quest™ Advanced 8.0.1. Para la evaluación de los spots de proteínas diferencialmente expresadas se hará la prueba t de Student.

10. Resultados y análisis de resultados.

Para que un virus se apodere del metabolismo celular, tiene que ocurrir un proceso de unión de moléculas determinadas de la estructura viral a receptores específicos que se encuentran ubicados en la superficie de la membrana celular. Este primer paso es de suma importancia ya que, cuando se lleva a cabo el reconocimiento, el virus se internaliza por endocitosis. Una vez libre su genoma, comienza una serie de modificaciones celulares a nivel proteínico que conllevan a la formación de una nueva progenie del virus. En el caso de influenza A, la molécula de hemaglutinina es reconocida por el receptor celular, el ácido siálico con enlaces de tipo α -2,3 y α -2,6 (Mancipe, 2011). Existen diferentes tipos de técnicas para comprobar la infección viral *in vitro*, como la técnica de titulación por ensayo de hemaglutinación, que se basa en la unión de la hemaglutinina a los residuos de ácido siálico que se encuentran en las membranas de los eritrocitos tipo O. Esta interacción específica se observa macroscópicamente como la formación de una malla, la cual indica la presencia de partículas virales por microlitro (pv/ μ L), que indirectamente evidencia la replicación y propagación viral.

En nuestros experimentos, realizamos titulaciones virales en dos etapas. En una etapa inicial se partió de un título desconocido del virus, el cual se determinó por este método obteniendo 2.06×10^6 pv/ μ L para la cepa H1N1/A/México/4482/2009 y 1.03×10^6 pv/ μ L para la cepa H1N1/A/PR/8/34) con estas concentraciones virales se realizaron infecciones posteriores con una mutiplicidad de infección (MOI) de 6, para ulteriores estudios proteómicos,

En una segunda etapa, el método de titulación por hemaglutinación se utilizó como una manera para verificar la infección de las células MDCK y Hep-2 como se muestra en las siguientes figuras 12-15:

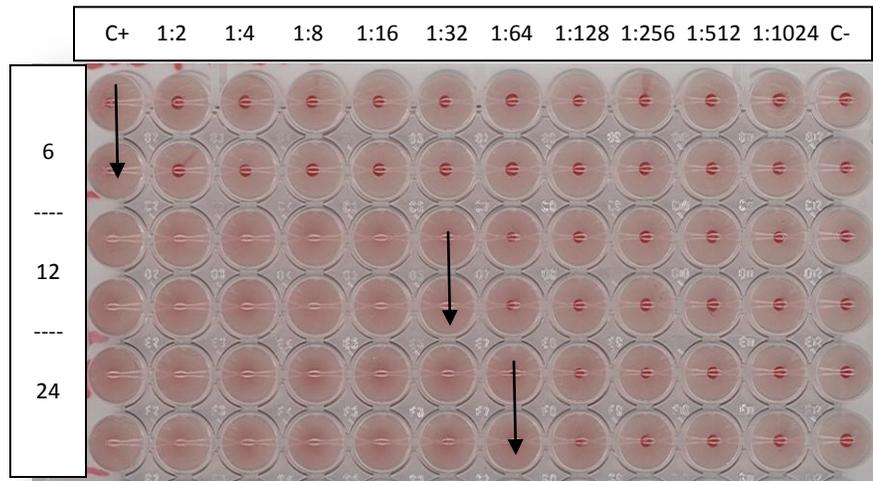


Figura 12. Titulación de virus de influenza H1N1/A/México/4482/2009 infectado en células MDCK a las 6, 12 y 24 horas post-infección (hpi) con una MOI de 6 mostrando un título viral de 1:32 y 1:64 a partir de las 12 y 24 hpi

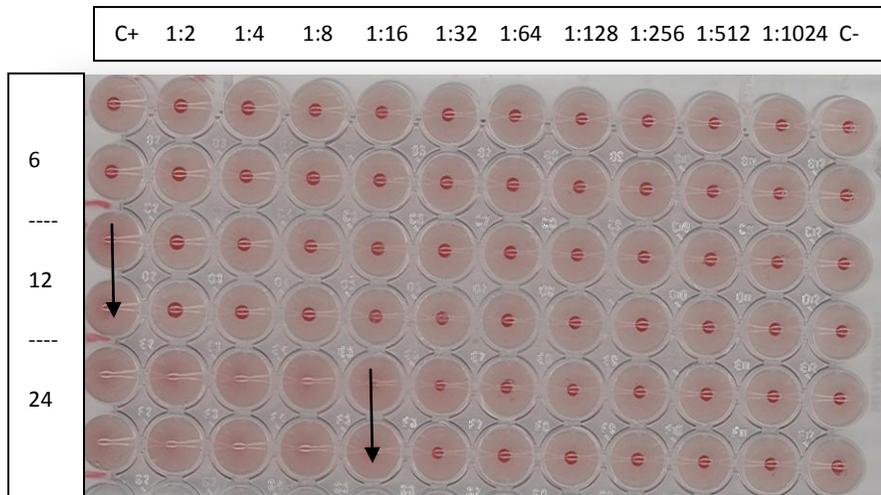


Figura 13. Titulación de virus de influenza H1N1/A/PR/8/34 infectado en células MDCK a las 6, 12 y 24 horas post-infección con un MOI de 6 mostrando un título viral de 1:16 a las 24hpi

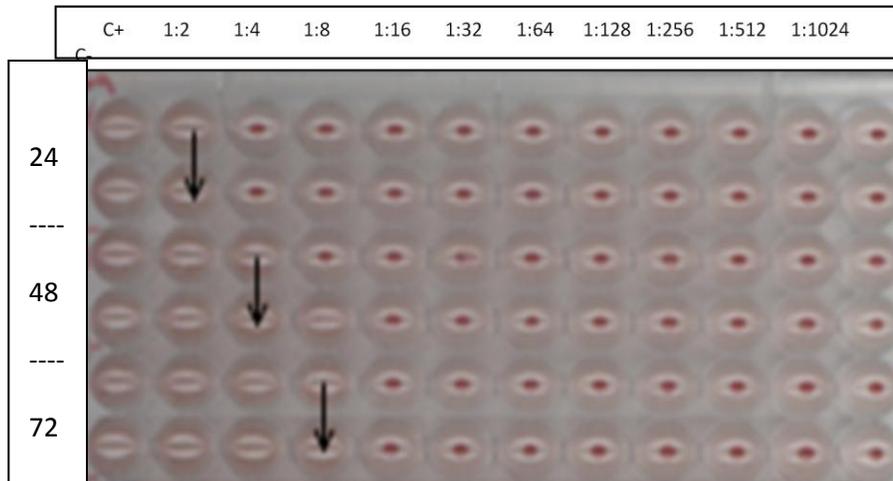


Figura 14. Titulación de virus de influenza H1N1/A/México/4482/2009 en células Hep-2 a las 24, 48 y 72 horas post-infección MOI de 6 mostrando un título viral de 1:2, 1:4 y 1:8 respectivamente.

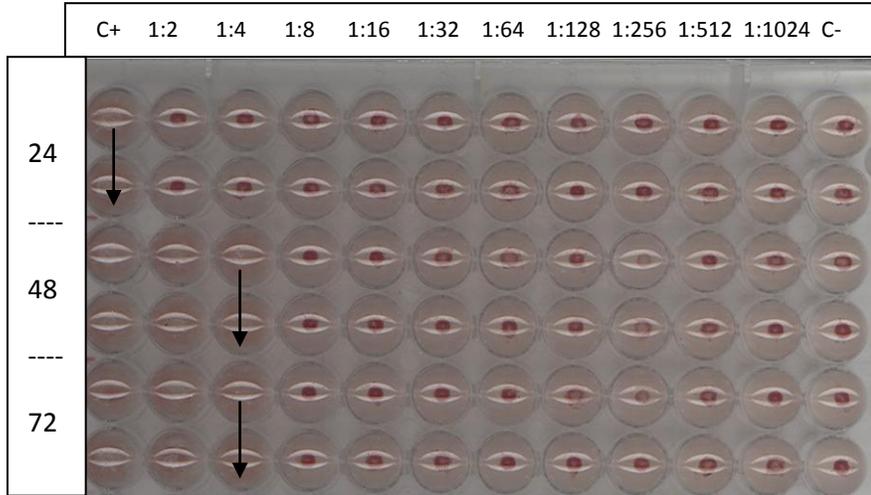
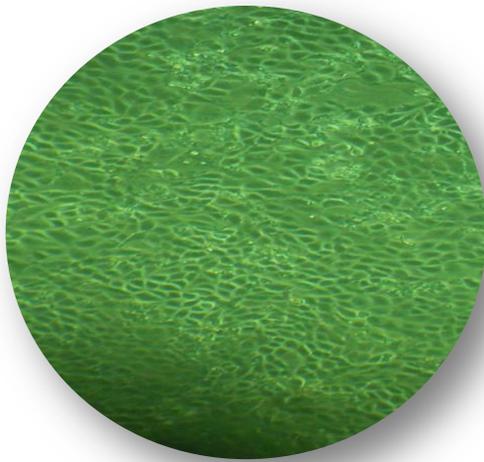


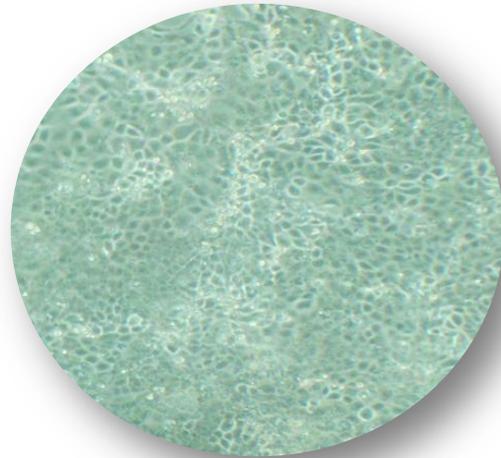
Figura 15. Titulación de virus de influenza H1N1/A/PR/8/34 infectado en células Hep-2 a las 24, 48 y 72 horas post-infección con un MOI de 6 mostrando un título viral de 1:4 a partir de las 48 hpi y las 72 hpi

Donde se nota que el virus de influenza A cepa pandémica H1N1/A/México/4482/2009 tiene mayor potencial infectivo al observarse títulos virales mayores durante la infección en las líneas celulares MDCK y Hep-2, esta medida puede ser comparada ya que la infección se realizó con un misma concentración viral inicial (MOI 6), en donde se alcanza un título mayor a las 24 hpi con 5.13×10^5 pv/ μ L en células MDCK y 72 hpi con un 6.34×10^4 pv/ μ L en células Hep-2, estos títulos comparados con la cepa estacional H1N1/A/PR/8/34, la cual muestra un título de 2.56×10^5 pv/ μ L en la línea celular MDCK y 3.20×10^4 pv/ μ L para Hep-2 bajo las mismas condiciones de infección muestran una reducción en el título viral. Estas variaciones en el título pueden explicarse ya que se ha reportado en anteriores estudios que la línea celular MDCK poseen receptores con ambos tipos de enlaces α -2,3 y α -2,6, lo que permite el crecimiento de un mayor espectro de cepas del virus de influenza A (Mancipe, Ramírez, Jairo y Vera, 2011). Aunque Mancipe et al., se refiere a las células epiteliales de tráquea humana (Hep-2) como células receptoras del virus de influenza, se ha reportado que la línea celular de elección para el crecimiento de este virus son las células epiteliales MDCK. También estas células son utilizadas en la producción comercial de vacunas inactivadas en Europa y para investigaciones clínicas en los Estados Unidos, ya que los virus muestran que han sido antigénica y estructuralmente idénticos a las cepas encontradas en pacientes.(Clavijo A, Tresnan DB, Jolie R, Zhou EM, 2002)

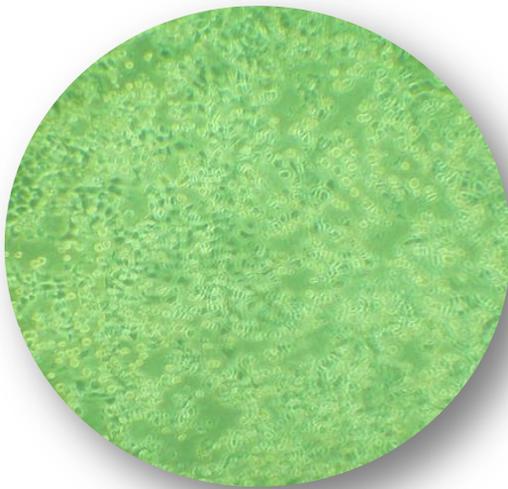
De igual forma se siguió la infección mediante la observación microscópica de las células infectadas, ya que se conoce que el virus de influenza tiene un tiempo de incubación de uno a tres días en el organismo. Después de este lapso, el virus se multiplica y trasciende a células aledañas. Este virus es citopático, ya que causa gran daño celular tanto por necrosis como por apoptosis (Pérez et al., 2010). Este efecto citopático se puede observar en las siguientes figuras que corresponden a células MDCK infectadas con ambas cepas virales:



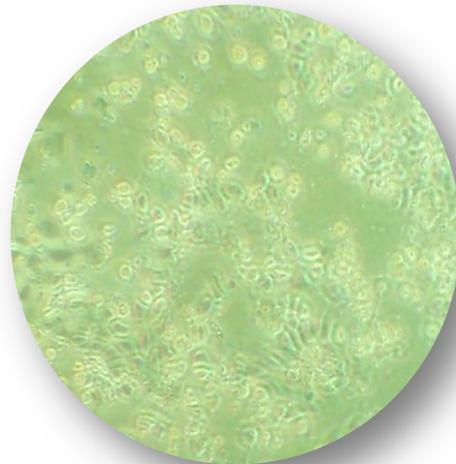
**Figura 16. Células MDCK control
sin infección 10X**



**Figura 17. Células MDCK infectadas con la cepa
H1N1/A/México/4482/México/4482/2009 a las 6hpi 10X**



**Figura 18. Células MDCK infectadas con la cepa
H1N1/A/México/4482/2009 a las 12 hpi10X**



**Figura 19. Células MDCK infectadas con la
cepa H1N1/A/México/4482/2009 a las 24 hpi 10X**

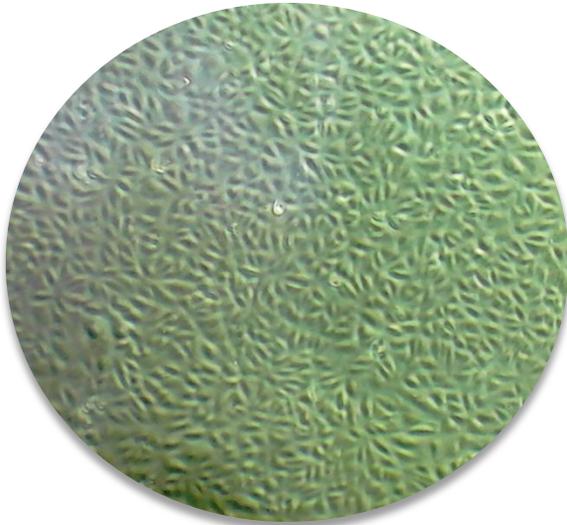


Figura 20. Células MDCK control sin infección 10X

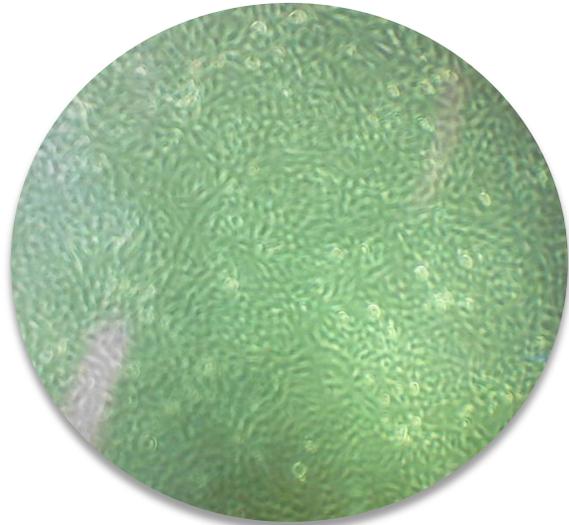


Figura 21. Células MDCK infectadas con la cepa H1N1/A/PR/8/34 a las 6hpi 10X

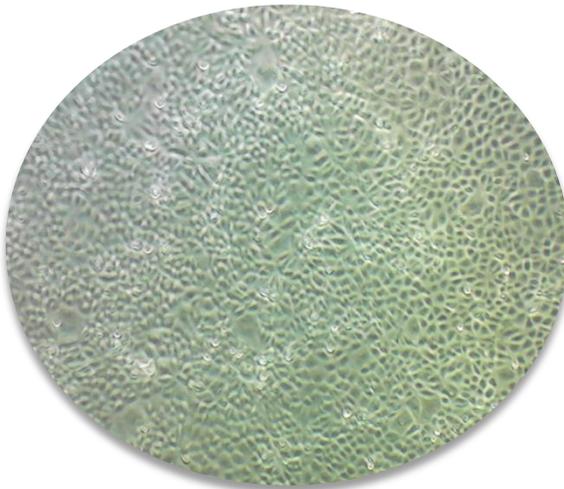


Figura 22. Células MDCK infectadas con la cepa H1N1/A/PR/8/34 a las 12 hpi 10X

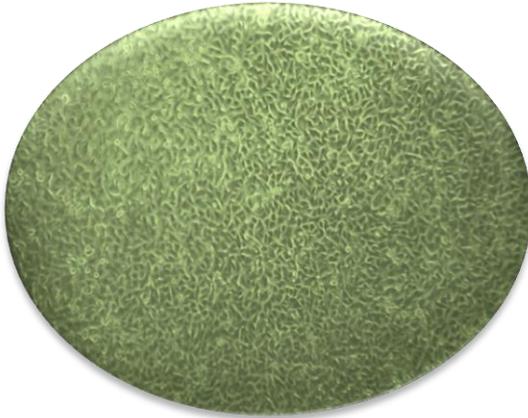


Figura 23. Células MDCK infectadas con la cepa H1N1/A/PR/8/34 a las 24hpi 10X

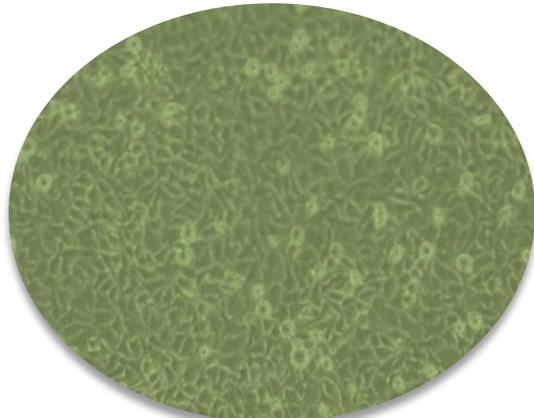
En estas figuras se el efecto citopático observado desde un microscopio óptico invertido durante la infección de influenza con la cepa pandémica y estacional comparadas con las células control sin infección, las cuales muestran una monocapa uniforme con un 95-100% de confluencia en donde la infección con la cepa pandémica H1N1/A/México/4482/2009 a

diferentes tiempos post-infección muestra un desprendimiento y cambio en la morfología celular en comparación con la cepa estacional H1N1/A/PR/8/34 que muestra menor desprendimiento de células y cambio en la morfología celular.

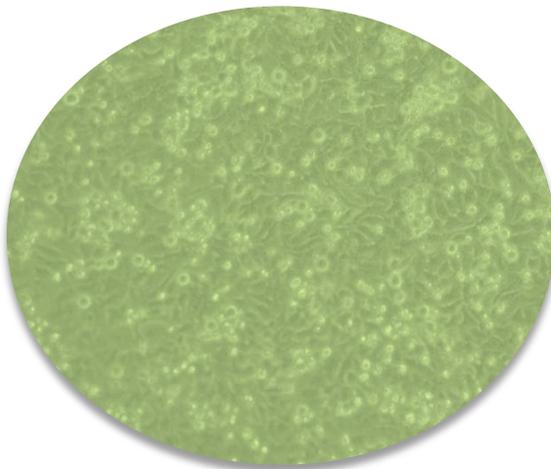
También se observó el efecto citopático en la línea celular Hep-2, estas se muestran en las siguientes figuras:



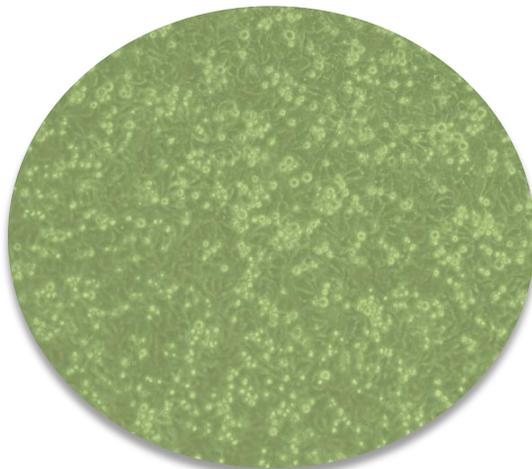
**Figura 24. Células Hep-2 control
sin infección 10X**



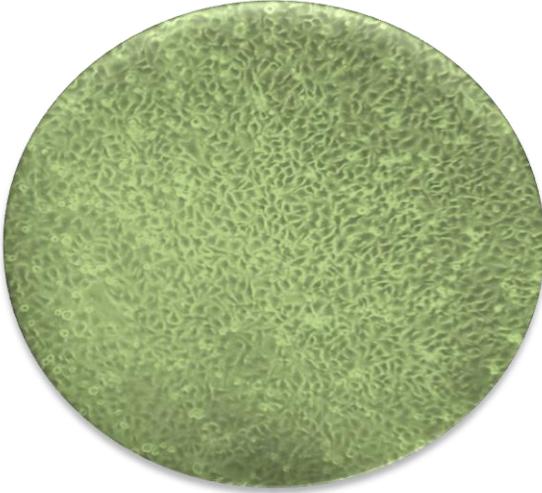
**Figura 25. Células Hep-2 infectadas con la
cepa H1N1/A/México/4482/2009 a las 24 hpi 10X**



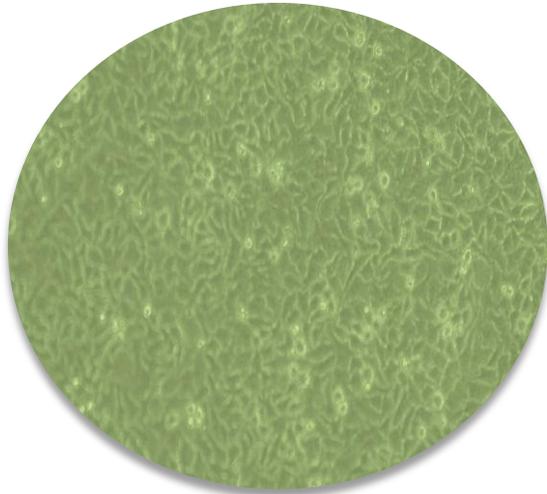
**Figura 26. Células Hep-2 infectadas con la cepa
H1N1/A/México/4482/2009 a las 48 hpi 10X**



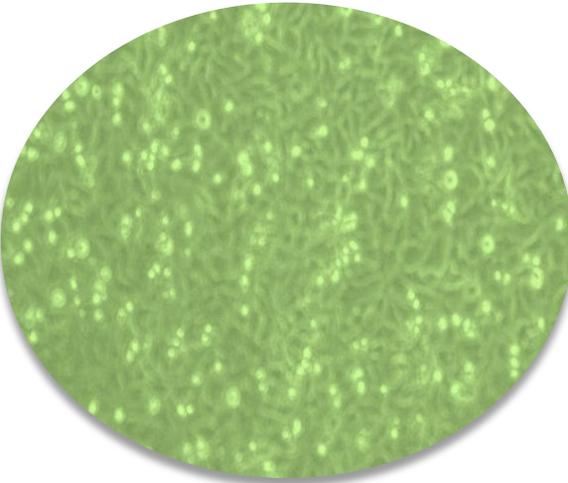
**Figura 27. Células Hep-2 infectadas con la
cepa H1N1/A/México/4482/2009 a las 72 hpi 10X**



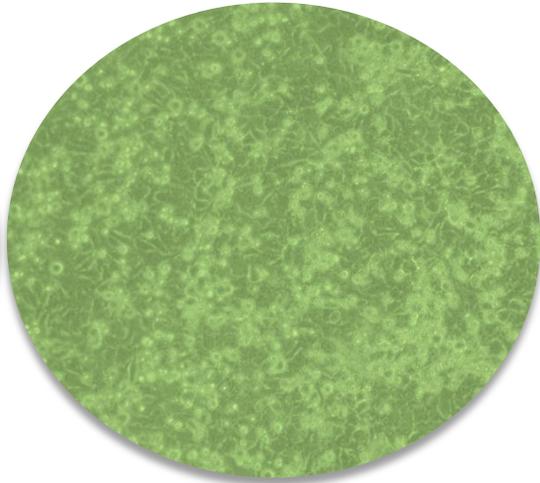
**Figura 28. Células Hep-2 Control
sin infectar 10X**



**Figura 29. Células Hep-2 infectados con la
cepa H1N1/A/PR/8/34 a las 24hpi 10X**



**Figura 30. Células Hep-2 infectadas con la
cepa H1N1/A/PR/8/34 a las 48 10X**



**Figura 31. Células Hep-2 con la
cepa H1N1/A/PR/8/34 a las 72hpi 10X**

En las figuras anteriores se observa el desprendimiento y agrandamiento de las células Hep-2 durante la infección con las dos cepas virales más evidente en las células infectadas con la cepa pandémica.

En cuanto a la infección de la línea celular A549 al no haber título viral y no hacerse visible el efecto citopático se prosiguió a realizar la técnica de inmunofluorescencia. Esta técnica es más sensible para detectar la infección viral por influenza, obteniendo los siguientes resultados:

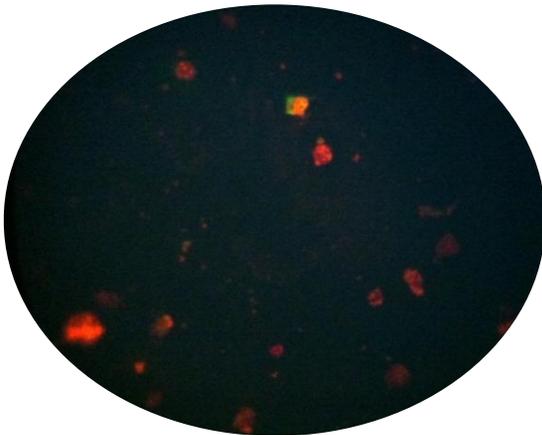


Figura 32. Células A549 infectadas con H1N1/A/México/4482/2009 2º pase celular.

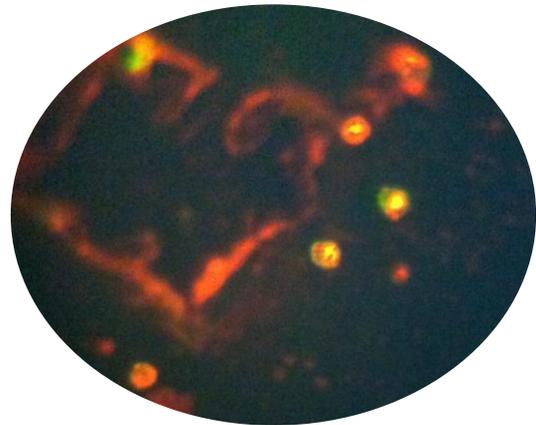


Figura 33. Células A549 infectadas con H1N1/A/México/4482/2009 4º pase celular.

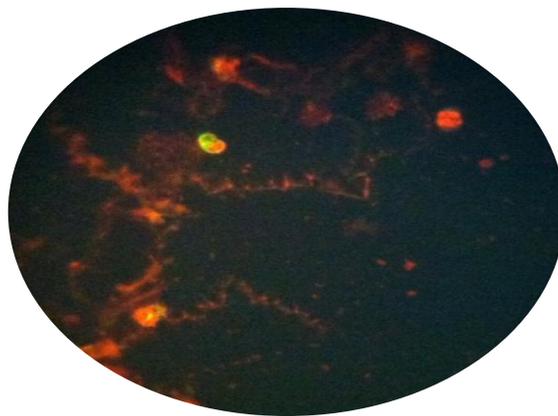


Figura 34. Células A549 infectadas con H1N1/A/PR/8/34 2º pase celular.

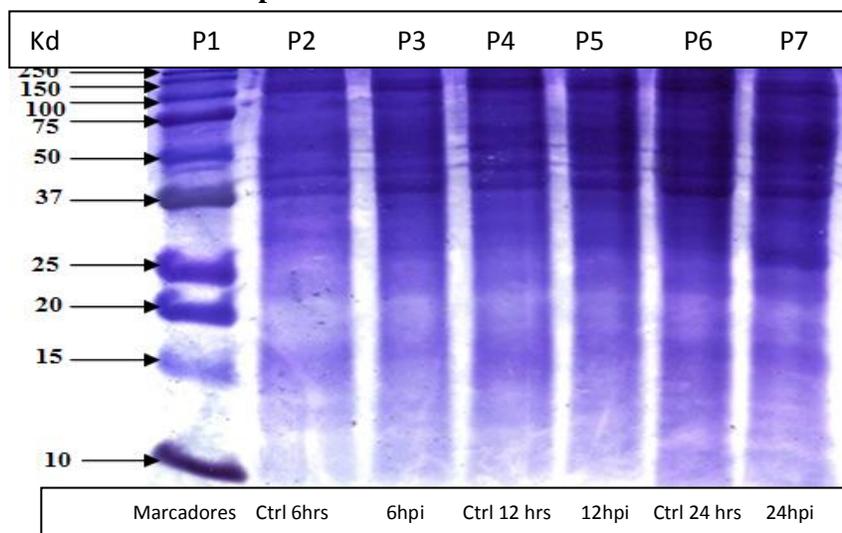
La sensibilidad y especificidad de esta técnica se basa en la detección de antígeno viral, mediante la unión covalente de un anticuerpo marcado con un fluorocromo. En nuestros

experimentos se lleva a cabo la adaptación de las dos cepas virales de influenza a la línea celular A549, que deriva de un carcinoma pulmonar humano, por lo que, al provenir de vías respiratorias inferiores, no cuenta con la cantidad suficiente de receptores α -2,6 para permitir la propagación viral y efecto citopático. Por lo que es necesaria la adición de una enzima proteolítica como la tripsina para la activación de la hemaglutinina inactiva (HA0), que se divide en las fracciones activas HA1 y HA2 (Mancipe et al., 2011), haciendo el virus infeccioso para las células. Por lo que la infección se comprobó mediante la técnica de IFI, donde la fluorescencia color verde indica la presencia de partículas virales de influenza A.

Cuando ocurre una infección viral la célula huésped sufre cambios morfológicos y subcelulares. Esto se debe a que el virus se apodera del metabolismo celular, lo que produce alteraciones en la expresión de genes que se refleja en la traducción de proteínas citoplasmáticas. Como primera parte del proyecto se llevó a cabo un lisado de líneas celulares MDCK y Hep-2 para la extracción de proteínas citoplasmáticas y, en posteriores estudios, llevar a cabo un análisis proteómico.

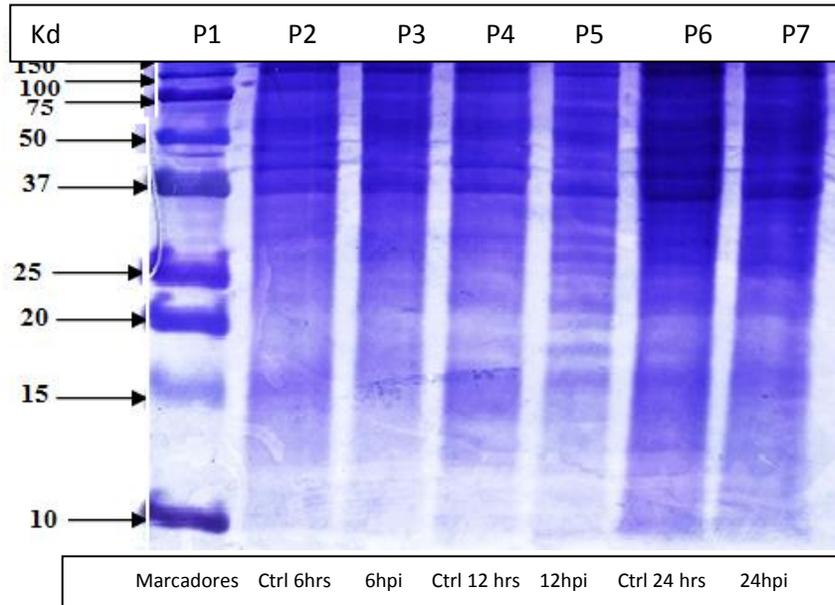
En nuestros experimentos se cuantificaron las proteínas solubles extraídas y se realizaron geles unidimensionales como se muestran en las figuras 35-38.

Figura 35. Electroforesis unidimensionales de lisados celulares de MDCK infectados con la cepa H1N1/A/México/4482/2009.



Geles de SDS-PAGE, 5% gel separador, 12% gel de resolución, tinción azul de Coomassie. Se cargaron muestras de lisado de células MDCK con 50 μ g de proteína por pozo.

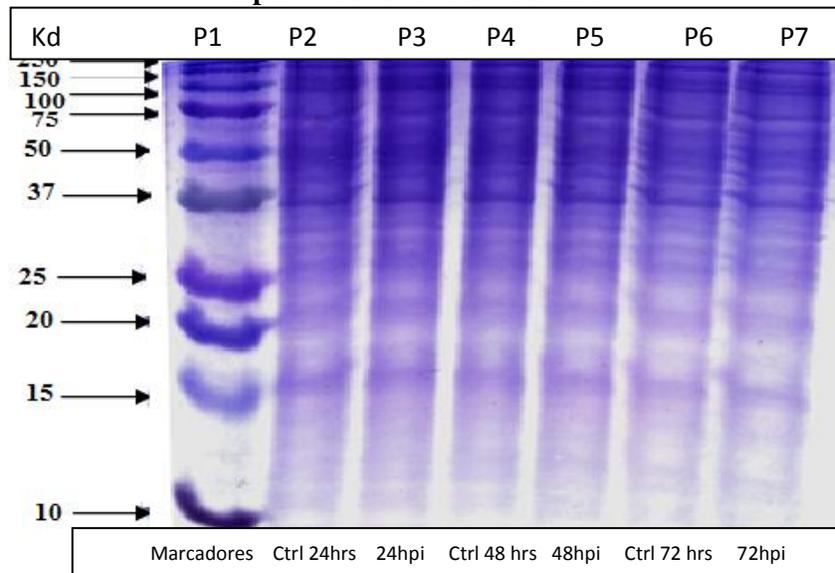
Figura 36. Electroforesis unidimensionales de lisados celulares de MDCK infectados con la cepa H1N1/A/PR/8/34.



Geles de SDS-PAGE, 5% gel separador, 12% gel de resolución, tinción azul de Coomassie. Se cargaron muestras de lisado de células MDCK con 50 µg de proteína por pozo.

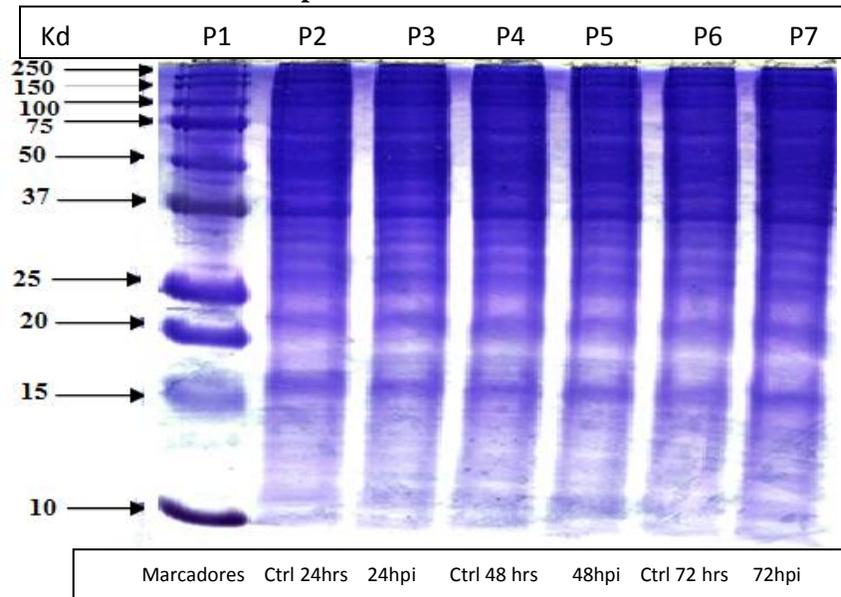
También se realizaron geles unidimensionales de los lisados celulares de Hep-2 como se muestra en las siguientes figuras 37 y 38:

Figura 37. Electroforesis unidimensionales de lisados celulares de Hep-2 infectados con la cepa H1N1/A/México/4482/2009.



Geles de SDS-PAGE, 5% gel separador, 12% gel de resolución, tinción azul de Coomassie. Se cargaron muestras de lisado de células Hep-2 con 50 µg de proteína por pozo.

Figura 38. Electroforesis unidimensionales de lisados celulares de Hep-2 infectados con la cepa H1N1/A/PR/8/34.

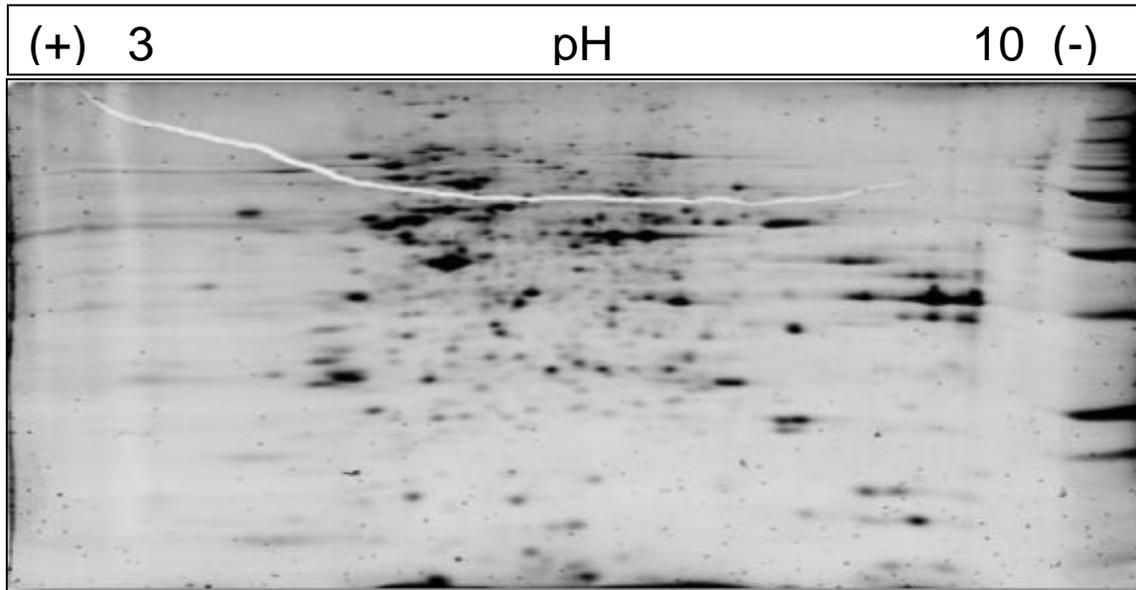


Geles de SDS-PAGE, 5% gel separador, 12% gel de resolución, tinción azul de Coomassie. Se cargaron muestras de lisado de células Hep-2 con 50 µg de proteína por pozo.

Este procedimiento de separación tiene la finalidad de comprobar la integridad proteínica a las diferentes horas post-infección, ya que el observar bandas definidas es indicativo de la presencia de proteínas con diferentes pesos moleculares.

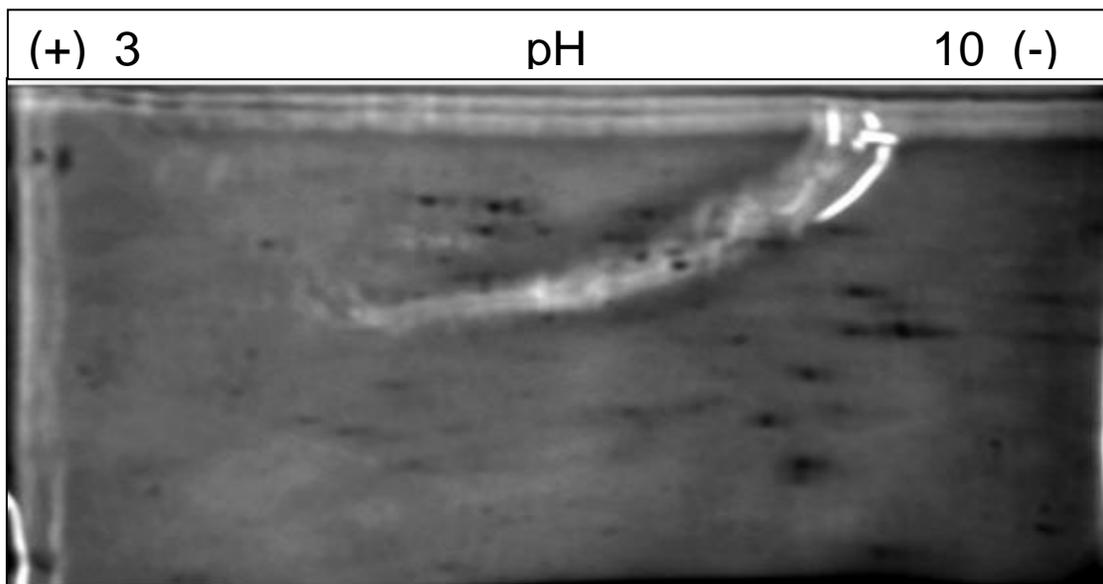
Aunque se pueden identificar los pesos moleculares de diversas proteínas en geles unidimensionales, existen similitudes entre ellas, por lo que es necesario utilizar otros métodos de separación como electroforesis bidimensional. En nuestros experimentos se realizó una separación bidimensional como se muestra en las siguientes figuras:

Figura 39. Gel bidimensional de muestra de lisado de células MDCK control sin infección a las 6 horas



(25µg de proteínas; tinción Deep Purple, gel de Poliacrilamida al 12% de resolución)

Figura 40. Gel bidimensional de muestra de lisado de células MDCK infectadas con la cepa H1N1/A/México/4482/2009 a las 6 hpi



(25µg de proteínas; tinción azul de Coomassie, gel de Poliacrilamida 12% de resolución)

Este método tiene dos etapas de separación; por punto isoeléctrico que separa las proteínas en un gradiente de pH hasta alcanzar una posición en la que la carga neta es cero, es decir, su punto isoeléctrico (pI) y peso molecular, ésta segunda dimensión separa las proteínas por peso molecular mediante electroforesis. Ésta herramienta proteómica mejora la separación e identificación de cientos de proteínas en un solo experimento, como se puede observar en las figuras 39 y 40. En este trabajo se determinaron las condiciones óptimas de separación proteínica aceptándose las hipótesis planteadas para posteriores análisis proteómicos en colaboración con el Instituto de Medicina Genómica (INMEGEN), donde se enviaron las muestras de proteínas cuantificadas y desaladas para llevar a cabo el estudio proteómico.

11. Conclusiones.

- Se estableció que las condiciones de infección por el virus de influenza H1N1/A/México/4482/2009 y H1N1/A/PR/8/34 para células MDCK fueron de un MOI de 0.1 para propagar el virus y de un MOI de 6 para realizar extracción de proteínas a las 6, 12 y 24 hpi
- Se estableció que las condiciones de infección por el virus de influenza H1N1/A/México/4482/2009 y H1N1/A/PR/8/34 para células Hep-2 fueron de un MOI de 0.1 para propagar el virus y de un MOI de 6 para realizar extracción de proteínas a las 24, 48 y 72 hpi
- Se identificaron alteraciones morfológicas y se observó desprendimiento de las células en la línea celular MDCK y Hep-2 por la infección del virus de influenza H1N1/A/México/4482/2009 y H1N1/A/PR/8/34 con un MOI de 6
- Se identificó la infección viral en la línea celular MDCK a las 6, 12 y 24 hpi mediante titulación por ensayo de hemaglutinación
- Se identificó la infección viral en la línea celular Hep-2 a las 24, 48 y 72 hpi mediante titulación por ensayo de hemaglutinación
- Se identificó la infección viral en la línea celular A549 mediante la técnica de inmunofluorescencia.

- Se estableció que la técnica de extracción de proteínas con Tritón X-100 al 0.1% es el indicado para realizar el lisado celular y es compatible con el método de cuantificación de proteínas mediante el ensayo de ácido bicinoninico (BCA)
- Se comprobó la integridad proteínica mediante la realización de geles unidimensionales para las muestras de lisados de células MDCK y Hep-2
- Se identificaron las condiciones óptimas para la separación de proteínas mediante electroforesis bidimensional las cuales fueron en la primera etapa por isoelectroenfoque el voltaje fue de 100, 300, 1000, 5000 y 5000 volts con tiempos de 2:00 00:40, 00:27, 01:20 y 00:15 horas respectivamente y en una segunda etapa la concentración del gel de resolución de poliacrilamida fue al 12% y la tinción adecuada para un análisis proteómico diferencial ulterior es con Deep-Purple.

12. Referencias.

- Abbas, A, K, Lichtman H, A. (2004) *Inmunología celular y molecular* 5ª ed Editorial Elsevier, México, D.F. 563p.
- Ayora T, G. (1999) *Influenza: Historia de una enfermedad*. Rev Biomed 10:57-61. Vol. 10/No. 1/Enero-Marzo, 1999 <http://www.medigraphic.com>
- Bellos, A., Mulholland, K., O'Brien, K. L., Qazi, S. A., Gayer, M., y Checchi, F. (2010). The burden of acute respiratory infections in crisis-affected populations: a systematic review. *Confl Health* 4(1), 3.
- Beveridge, W. I. (1991). The chronicle of influenza pandemics. *Hist. Philos. Life Sci.* 13: 223-234.
- Brammer T,L, Murray E,L, Fukuda K, Hall H,E, Klimov A, y Cox N,J. (2002). Surveillance for influenza United States, 1997-98, 1998-99, and 1999-00 seasons. *MMWR Surveill Summ*; 51(7):1-10.
- Brockwell S, C, Webster, R, G, y Webby R, J. (2009) Diversity of Influenza Viruses in Swine and the Emergence of a Novel Human Pandemic Influenza A (H1N1) Influenza Other Respi Viruses. 2009 September 1; 3(5): 207–213. doi:10.1111/j.1750-2659.2009.00096.x.
- Brooks, G, F, Carroll, K, C. Butel, J, S. Morse, S, A. y Mietzner, T, A. (2008). *Microbiología Médica de Jawets, Melnick y Adelberg* 19ª Edición, El Manual Moderno, México D.F. 807 pp.
- Cabezas J,A. (2005). Nuevos datos acerca del virus causante de la pandemia de gripe de 1918-19 y su relación con los de la gripe aviar. *Anal. Real Acad. Nac. Farm.* 71: 83-110
- Chowell G, Echevarría S, Viboud C, Simonsen L, y Miller M,A. (2012). Epidemiological Characteristics and Underlying Risk Factors for Mortality during the Autumn 2009 Pandemic Wave in Mexico. *PLoS ONE* 7(7): e41069. Doi :10.1371/ journal.pone.0041069

- Clavijo A, Tresnan D,B, Jolie R, y Zhou E,M. (2002). Comparison of embryonated chicken eggs with MDCK cell culture for the isolation of swine influenza virus. *The Canadian Journal of Veterinary Research*. 2002; 66:117.121)
- Clifford, M, Twigg, J, y Upton, C. (2009). Evidence for a novel gene associated with human influenza A viruses, *Virology Journal* 2009, 6:198 doi:10.1186/1743-422X-6-198
- Coll, M, J. (1993). Técnicas de Diagnóstico en Virología Editorial Díaz de Santos, pags. 360 Libro electrónico disponible en: www.agapea.com/Tecnicas-de-diagnostico-en-virologia-n39899i.htm
- Contreras, N, C, Silva, C, T, Hopkins J, W. (2009). Citogenética aplicada a la medicina. Escuela de medicina y Ciencias de la Salud. Bogotá Edit. Universidad del Rosario, pag. 10-15
- Córdova, J, A, Valdespino, J, y Ponce D,S. (2010). The Influenza A/H1N1 Epidemic in México Ed Médica Panamericana, pags. 363.
- Hatta, M., Kawaoka, Y. (2003). The NB Protein of Influenza B Virus Is Not Necessary for Virus Replication In Vitro *Journal of Virology*, 77 (10), 6050-6054 DOI: 10.1128/JVI.77.10.6050-6054.2003
- Hernández, F, Rodriguez, M. (2009). Biotechnological advances in infectious diseases diagnosis, *Salud pública Méx* vol.51 supl.3 Cuernavaca
- Huang S, H, Banner D, Fang Y, Derek C,K, Kanagasabai T, y Kelvin, A, A. (2011). Comparative Analyses of Pandemic H1N1 and Seasonal H1N1, H3N2, and Influenza B Infections Depict Distinct Clinical Pictures in Ferrets. *PLoS ONE* 6(11): e27512. doi:10.1371/journal.pone. 0027512
- Hsieh Y,H, Velasco J,X, Lee V,J, y Lim W,Y. (2011). Early Outbreak of 2009 Influenza A (H1N1) in Mexico Prior to Identification of pH1N1 Virus. *PLoS ONE* 6(8): e23853. doi:10.1371/journal.pone.0023853

- Kowalinski, E, Zubieta, C, Wolkerstorfer A. (2012). Structural Analysis of Specific Metal Chelating Inhibitor Binding to the Endonuclease Domain of Influenza pH1N1 (2009) Polymerase. PLoS Pathog 8(8): e1002831.doi:10-1371/journal.ppat.1002831
- Luo J, Zheng D, Zhang W, Fang F, Wang H, Sun Y, Ding Y, Xu C, Chen Q, Zhang H, Huang D, Sun B, y Chen Z. (2010). Induction of cross-protection against influenza A virus by DNA prime-intranasal protein boost strategy based on nucleoprotein. Virology Journal 2012, 9:286
- Mancipe L, Ramírez N Jairo J. C, y Vera V. A. (2011). Cultivos celulares como alternativa para el aislamiento y la producción de biológicos contra el Virus de Influenza ISSN:1794-2470 año - VoL.9 No. 15 - Enero - Junio de 2011: 1-112
- Murray, P, Rosenthal, K., Kobayashi, G., y Pfaller, M. (2003). Microbiología Médica 4a Edición Elsevier, Madrid España, pag. 810.
- Pérez, J.R., Salas, J, Vazquez J,C, Palomar A. (2010). Influenza por el nuevo virus A H1N1. Un panorama Integral. ed. gaphimedic, México D.F. pag. 484
- Pyle, G, F, (1986) The diffusion of influenza: patterns, and paradigms. Totowa, NJ: Rowman & Littlefield.
- Shapira, S, D, Viks, B, O, Shum, A, Dricot M, M. de Grace, L. G. Wu, P, B, Gupta T, Hao S, J, Silver, D, E, Root D, E. Hill, A. Regev, y N. Hacohen. (2009) A Physical and Regulatory Map of Host-Influenza Interactions Reveals Pathways in H1N1 Infection Cell 139, 1255–1267, December 24, 2009 ©2009 Elsevier Inc.
- Taubenberger J,K, Morens D,M. (2009). Pandemic influenza--including a risk assessment of H5N1. Rev Sci Tech.; 28(1):187-202.
- Tosh P,K, Jacobson R,M. y Poland G,A. (2010). Influenza Vaccines: From Surveillance Through Production to Protection. Mayo Clin Proc. 2010 March; 85(3): 257–273.

Tong, S., Li, Y, Rivaller, P, Conrardy, C, Castillo, D. A, A., y Chen, L.M. (2012). A distinct lineage of influenza A virus from bats. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109: 4269-4274.

Van de Sandt, C.,E., Joost, H.,C, Rimmelzwaan Kreijtz y Guus. (2012). Evasion of influenza A Viruses from Innate and Adaptative Immune Responses. *Viruses* 2012, 4, 1438-1476; doi:10.3390/v4091438

Virgili, O,R., y Vidal, T, J. (2006). Genoma humano: nuevos avances en investigación, diagnóstico y tratamiento, Vol 2 de Ube: Medicina Edit. Universidad de Barcelona, Madrid, España Pags 108-115

Wiedbrauk, D.L. y Johnston, S.L. (1993). *Manual of Clinical Virology*. Raven Press. New York. 40-45 p.

Zepeda L, H,M, Perea A, L, Miliar G, A, Domínguez L, A, y Xoconostle, C, B. (2010) Inside the Outbreak of the 2009 Influenza A (H1N1)v Virus in Mexico. *PLoS ONE* 5(10): e13256. doi:10.1371/journal.pone.0013256.

ATCC, Advanced catalog 2012a. MDCK cell line, CCL-34. Consultado el 20 de Diciembre de 2012. Disponible en: <http://www.atcc.org/attachments/17405.pdf>

ATCC, Advanced catalog 2012b. MDCK cell line, CCL-185. Consultado el 20 de Diciembre de 2012. Disponible en: <http://www.atcc.org/attachments/17395.pdf>

ATCC, Advanced catalog 2012b. MDCK cell line, CCL-25. Consultado el 29 de enero de 2013. Disponible en: <http://www.atcc.org/attachments/17501.pdf>

US Department of Health and Human Services; National Institutes of Health. Flu (influenza). National Institute of Allergy and Infectious Diseases Consultado el día 27 de diciembre del 2012a. Disponible en: <http://www.niaid.nih.gov/topics/Flu/Research/basic/Pages/AntigenicDriftIllustration.aspx>.

US Department of Health and Human Services; National Institutes of Health. Flu (influenza). National Institute of Allergy and Infectious Diseases Consultado el día 27

de diciembre del 2012b. Disponible en:

<http://www.niaid.nih.gov/topics/Flu/Research/basic/Pages/AntigenicShiftIllustration.aspx>

WHO. 2012. Acute Respiratory Infections (Update December 2012) Consultado el día 07 de diciembre de 2012. Disponible en:

http://www.who.int/influenza/gisrs_laboratory/updates/summaryreport/en/index.html#

WHO. 2009. Acute Respiratory Infections (Update September 2009) Consultado el día 16 de Agosto de 2012. Disponible en:

http://www.who.int/vaccine_research/diseases/ari/en/index1.html#

13. Anexos

1. Preparación de medio de cultivo completo (MEMC)

Para 500 mL	
500 mL	Medio elemental mínimo (MEM)
5.3 mL	L-glutamina 200 mM
2.5 mL	Antibiótico-antimicótico 1X
1.85 g	Bicarbonato de Sodio
50 mL	Suero Fetal Bovino (SFB)

- a) Colocar 50 mL de DMEM en un tubo FALCON y disolver completamente 1.85g de bicarbonato de sodio.
- b) En un frasco de 500 mL de DMEM adicionar 5.3 mL de L-glutamina 200 Mm y 2.5 mL de antibiótico-antimicótico.
- c) Agregar los 50mL de bicarbonato de sodio filtrándolo, utilizando un filtro de malla de 0.22 μ m marca millipore.
- d) Finalmente adicionar 50 mL de SFB, mezclar con movimientos circulares sin que se moje la boca del frasco para evitar contaminación.
- e) Almacenarlo a 4°C.

2. Descomplementación del Suero Fetal Bovino (SFB)

- a) Descomplementar el suero a 56°C por 30 minutos en Baño María.
- b) Filtrar con membrana de 0.22 μ m marca millipore en tubos de 50 mL estériles y congelar a -20C hasta su uso.
- c) Para preparar 10 mL de medio con suero al 10% en frascos estériles filtrar 90 mL de medio y adicionar 10 mL de suero filtrado.

Nota: El suero no debe congelarse y descongelarse para evitar su inactivación.

3. Solución de tripsina 1X

- a) Descongelar tripsina 10X marca Gibco® Trypsin tomar 5mL y agregar 45mL de PBS con pH 7.2 para obtener una concentración final de 1X

4. Solución PBS de pH 7.2

Para 1 L	
8 g	NaCl
0.2 g	KCl
0.96 g	Na ₂ HPO ₄
0.2 g	KH ₂ PO ₄

- a) Ajustar el pH a 7.2 con potenciómetro.
b) Aforar con agua destilada desionizada (H₂O dd)
c) Esterilizar con autoclave y hacer alícuotas de 200mL
d) Almacenar a temperatura ambiente.

5. Medio de congelación

Porcentaje	Componente
7 0%	Suero fetal bovino (SFB)
10%	Dimetil sulfóxido (DMSO)
20%	DMEM

6. Protocolo para congelación de líneas celulares

- a) Eliminar medio de la caja de cultivo y lavar la monocapa dos veces con 5 mL de PBS 1X pH 7.2 y eliminar.
- b) Adicionar 2 mL de tripsina al 1X golpear ligeramente los costados de la caja para despegar las células e incubar a 37°C durante 10 minutos o hasta que se vean despegadas las células.
- c) Inactivar la tripsina agregando 3 mL de MEMC.
- d) Extraer la suspensión celular y colocar en un tubo FALCON estéril.
- e) Centrifugar a 1500 rpm durante 10 min a 4°C.
- f) Eliminar el sobrenadante.
- g) Resuspender el pellet en 6mL de medio de congelación por caja T-25
- h) Distribuir la suspensión celular en criotubos colocando 1mL en cada uno y rotular.
- i) Conservar en ultracongelador a -80°C.

7. Protocolo de Tripsinización (Propagación celular)

- a) Eliminar medio de la caja de cultivo y lavar la monocapa dos veces con 5 mL de PBS 1X pH 7.2 y eliminar.
- b) Adicionar 2 mL de tripsina al 1X golpear ligeramente los costados de la caja para despegar las células e incubar a 37°C durante 10 minutos ó hasta que se vean despegadas las células.
- c) Inactivar la tripsina agregando 3 mL de MEMC.
- d) Extraer la suspensión celular y colocar en un tubo FALCON estéril.
- e) Centrifugar a 1500 rpm durante 10 minutos a 4°C.
- f) Eliminar el sobrenadante.
- a) Resuspender el pellet en X mL de MEMC hasta formar una suspensión celular homogénea (las cantidades de MEMC se adicionan de acuerdo al número de cajas en las cuáles se va a propagar).
- b) Incubar a 37°C y 5% de CO₂.

8. Protocolo para descongelación de líneas celulares

Método 1

- a) En una caja T-25 colocar 5 mL de MEMC.
- b) Descongelar un criotubo con células (es suficiente con el calor de la mano).
- c) Vertir la suspensión celular a la caja T-25, procurando hacerlo directamente al medio de cultivo.
- d) Resuspender por pipeteo hasta formar una suspensión celular homogénea.
- e) Incubar a 37°C y 5% de CO₂.
- f) Cambiar medio de cultivo a las 24 hrs para eliminar restos de DMSO.

Método 2

- c) En un tubo FALCON de 15 mL colocar 10 mL de MEMC.
- d) Descongelar un criotubo con células (es suficiente con el calor de la mano).
- e) Extraer células del criotubo y verter al tubo FALCON. Resuspender por pipeteo.
- f) Centrifugar a 1500 rpm durante 10 minutos a 4°C.
- g) Eliminar el sobrenadante.
- h) Resuspender el “pellet” en 5 mL de MEMC.
- i) Colocar la suspensión celular en una caja T-25; Resuspender por pipeteo hasta formar una suspensión celular homogénea.
- j) Incubar a 37°C y 5% de CO₂.
- k) Cambiar medio de cultivo cada 24 hrs.

8. Conteo celular

El conteo celular se determinó por el método de exclusión del azul de tripano.

- a) Tomar una alícuota de 50µL de la suspensión celular.
- b) Colocar 10 µL de azul de tripano en un tubo Eppendorff
- c) Colocar 10 µL de la suspensión de células en el parafilm y mezclar

- d) Montar la cámara de Neubauer.
- e) Colocar 10 μL de la mezcla en la cámara y observar al microscopio.
- f) Realizar conteo de células de los cuatro cuadrantes de los extremos y sacando el promedio se aplica la siguiente fórmula:

Células por mL = (Cuenta total de células vivas \div Número de cuadros 4x4 evaluados) \times factor de dilución $\times 10 \times 10^4$.

Células totales = (Células por mL \times volumen total en mL, del cual fueron extraídas las células evaluadas)

9. Técnica de hemaglutinación

- a) Obtener una muestra de sangre tipo “O” Rh “+” en tubos con coagulante citrato de sodio al 3.8%
- b) Marcar el volumen total de sangre en el tubo.
- c) Centrifugar a 1800rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente.
- d) Eliminar el suero y completar el volumen inicial con PBS.
- e) Repetir los pasos c) y d) hasta que el sobrenadante sea traslucido.
- f) Preparar una suspensión de eritrocitos al 0.5%, según el volumen que se vaya a utilizar.
- g) En una placa de 96 pozos, marcar según las diluciones y las muestras a colocar, así como controles positivos y negativos.
- h) Colocar en cada uno de los pozos a utilizar 25 μL de PBS
- i) En la hilera control y en la segunda hilera, colocar 25 μL del virus.
- j) Homogeneizar los pozos de la fila 2 y transferir 25 μL a los pozos de la fila 3.
- k) Homogeneizar los pozos de la fila 3 y transferir 25 μL a los pozos de la fila 4.
- l) Repetir la operación hasta los pozos de la fila 10.
- m) En los pozos de las filas de la 2 a la 12 colocar 25 μL de PBS.
- n) Colocar en todos los pozos 50 μL de la solución de eritrocitos.
- o) Incubar durante 60 minutos a 37° C con una atmosfera de 5% de CO_2 .
- p) Escanear o bien observar al microscopio para determinar el título del virus.

Se consideró el título viral a la máxima dilución del virus en la cual se observó aglutinación de eritrocitos, considerando el valor correspondiente a 1 unidad hemaglutinante (UHA).

10. Propagación viral H1N1/A/2009 y H1N1/A/PR/8/34/

Para virus 2009 Se realizó la propagación viral en placas de 12 pozos (Corning, NY, USA). Usando una alícuota de virus con título desconocido y se título.

Cálculos para realizar una infección de un MOI 0.01 para H1N1/A/2009 y H1N1/A/8/34

MOI 0.01 (0.01 pv/cel) en placa de 6 pozos

$$\# \text{ pv} = (\text{MOI}) (\# \text{ de células a infectar})$$

$$\# \text{ pv} = (0.01 \text{ pv/cel})(1.6 \times 10^5 \text{ células})$$

$$\# \text{ pv} = 0.016 \text{ pv/cel} (10^6 \text{ células})$$

$$\# \text{ pv} = 0.16 \text{ pv/cel} (10^6 \text{ células})$$

$$\# \text{ pv} = 0.16 \times 10^6 \text{ pv}$$

De acuerdo al título viral del virus utilizado 1:256, hay 0.0976 μL de la suspensión de virus original (solución concentrada viral), entonces se tiene que:

$$1 \text{ UHE} = 200,000 \text{ pv}$$

Por lo tanto:

$$\frac{\# \text{ pv}}{\text{Vol. del tít.}} = \frac{200,000 \text{ pv}}{0.0976 \mu\text{L}} = 2 \times 10^6 \text{ pv}/\mu\text{L}$$

Para determinar cuántos microlitros de la solución concentrada viral necesitamos tomar para un MOI de 0.01:

$$\mu\text{L} = \frac{0.16 \times 10^6 \text{ pv}}{2 \times 10^6 \text{ pv}/\mu\text{L}} = 0.08 \mu\text{L}$$

MOI 6 (6 pv/cel) en caja T-75

$$\# \text{ pv} = (\text{MOI}) (\# \text{ de células a infectar})$$

$$\# \text{ pv} = (6\text{pv/cel.}) (20,000,000 \text{ células})$$

$$\# \text{ pv} = 120,000,000\text{pv}$$

$$\frac{\# \text{ pv}}{V} = \frac{200,000 \text{ pv}}{0.0976 \mu\text{L}} = 2,049,180 \text{ pv}/\mu\text{L}$$

$$\mu\text{L} = \frac{120,000,000 \text{ pv}}{2,049,180 \text{ pv}/\mu\text{L}} = 58.5 \mu\text{L}$$

Para el virus estacional PR se realizó la propagación viral en placas de 12 pozos (Corning, NY, USA). Usando una alícuota de virus con título desconocido y se título.

Cálculos para realizar una infección de un MOI 0.01 para H1N1/A/2009 y H1N1/A/8/34

MOI 0.01 (0.01 pv/cel) en placa de 6 pozos

$$\# \text{ pv} = (\text{MOI}) (\# \text{ de células a infectar})$$

$$\# \text{ pv} = (0.01\text{pv/cel})(1.6 \times 10^5 \text{ células})$$

$$\# \text{ pv} = 0.016 \text{ pv/cel} (10^6 \text{ células})$$

$$\# \text{ pv} = 0.16 \text{ pv/cel} (10^6 \text{ células})$$

$$\# \text{ pv} = 0.16 \times 10^6 \text{ pv}$$

De acuerdo al título viral del virus utilizado 1:128, hay 0.195 µL de la suspensión de virus original (solución concentrada viral), entonces se tiene que:

$$1 \text{ UHE} = 200,000 \text{ pv}$$

Por lo tanto:

$$\frac{\# \text{ pv}}{\text{Vol. del tít.}} = \frac{200,000 \text{ pv}}{0.195 \mu\text{L}} = 1025641.06 \text{ pv}/\mu\text{L}$$

Para determinar cuántos microlitros de la solución concentrada viral necesitamos tomar para un MOI de 0.01:

$$\mu\text{L} = \frac{0.16 \times 10^6 \text{ pv}}{1025641.06 \text{ pv}/\mu\text{L}} = 0.15 \mu\text{L}$$

MOI 6 (6 pv/cel) en caja T-75

$$\# \text{ pv} = (\text{MOI}) (\# \text{ de células a infectar})$$

$$\# \text{ pv} = (6 \text{ pv/cel}) (20,000,000 \text{ células})$$

$$\# \text{ pv} = 120,000,000 \text{ pv}$$

$$\frac{\# \text{ pv}}{V} = \frac{200,000 \text{ pv}}{0.195 \mu\text{L}} = 1025641.02 \text{ pv}/\mu\text{L}$$

$$\mu\text{L} = \frac{120,000,000 \text{ pv}}{1025641.02 \text{ pv}/\mu\text{L}} = 117.00 \mu\text{L}$$

11. Lisis celular

Solución amortiguadora de lisis Tritón X-100 0.1%

Para 100 mL	
0.1 mL	Tritón 100X 0.1%
10 mL	10% Glicerol
0.242 g	20mM Tris
0.8 g	137mM NaCl
375 µL	Inhibidor de proteasas

- a) Ajustar el pH a 8.2 con el potenciómetro.
- b) Adicionar inhibidor de proteasas.
- b) Aforar con PBS.

Protocolo para llevar a cabo la lisis celular (método de lisis química y congelación – descongelación)

- a) Recolectar el medio de cultivo y lavar la monocapa dos veces con 5 mL de PBS 1X pH 7.2.
- b) Adicionar 1.5mL de Solución amortiguadora de lisis y colocar la caja T-75 en movimiento a 4°C durante 1 hora
- c) Disgregar la monocapa celular con ayuda de un “*cell scrapers*” estéril y colocar la suspensión celular en tubos Eppendorff de 1.5 mL y congelar a -80°C
- d) Sacar los tubos Eppendorff e incubar a 37°C hasta su descongelación.

e) Repetir el paso d) durante tres veces más para favorecer el rompimiento de la membrana celular.

f) Después de completado el ciclo de congelación – descongelación centrifugar a 13, 000 rpm durante 10 minutos a 4°C para remover restos celulares, y membranas.

g) Recolectar el sobrenadante y almacenarlo como el lisado celular a -80°C.

12. Cuantificación de proteínas por BCA

A) Preparar 6 diluciones del estándar de proteína (BCA) en un rango de trabajo de 5-250 µg/mL, utilizando como muestra blanco agua destilada. El procedimiento se detalla en la Tabla:

Preparación de estándares de BCA (Rango de trabajo: 20-2000 µg/mL)			
Vial	Volumen de diluyente (µL)	Volumen de BCA (µL)	Concentración final (µg/mL)
A	0	300 µL de solución concentrada	2000
B	125	375 µL de solución concentrada	1500
C	325	325 µL de solución concentrada	1000
D	175	175 µL de vial B	750
E	325	325 µL de vial C	500
F	325	325 µL de vial E	250
G	325	325 µL de vial F	125
H	400	100 µL de vial G	25
I	400	0	0 Blanco

Preparación de la curva estándar de BCA para la cuantificación de proteínas totales.

- a) Determinar el volumen del reactivo de trabajo (WR) necesario de acuerdo a la siguiente fórmula.

Volumen total de reactivo de trabajo requerido (WR) = (# de estándares + # de muestras) x (# de replicados) x (volumen de WR /muestra).

- b) Preparar el reactivo de trabajo mezclando 50 partes del reactivo de trabajo A con una parte del reactivo de trabajo B (relación 50:1 reactivo de trabajo A:B).
- c) Pipetear 25 μ L de estándares a los primeros pozos de la microplaca, a continuación agregar a los pozos subsiguientes 25 ó 10 μ L de muestra.
- d) Adicionar 200 μ L de reactivo de trabajo a cada pozo, incluyendo estándares; homogeneizar en agitación constante durante 30 segundos.
- e) Incubar a 37°C durante 30 minutos
- f) Enfriar la microplaca a temperatura ambiente.
- g) Medir la absorbancia a 560 nm en un lector de microplaca
- h) Preparar una curva estándar interpolando los valores de la absorbancia de la curva patrón y la absorbancia de cada muestra para determinar la concentración de proteína de cada muestra.

B) Desalado de muestra de proteínas con columnas de Cromatografía Micro Bio-Spin™.

- a) Invertir la columna varias veces para resuspender y eliminar las burbujas. Desprender la punta y colocar la columna en un tubo de microcentrifuga de 2mL (incluido). Quitar la tapa superior para que fluya el solución amortiguadora, aproximadamente 2 minutos, desechar el solución amortiguadora drenado.
- b) Centrifugar durante 4 minutos en una microcentrifuga a 1000x(G) para eliminar el solución amortiguadora de embalaje restante.
- c) Colocar la columna en un lugar limpio en un tubo de microcentrifuga de 2 mL. Aplicar cuidadosamente la muestra de (20-75 μ L) directamente al centro de la columna.
- d) Después de cargar la muestra, se centrifuga la columna durante 4 minutos a 1.000 x (G)

- e) Una vez centrifugada la muestra purificada Se recolecta la muestra y se realiza cuantificación de proteínas.

Tras la centrifugación, la muestra purificada se colocará ahora en un solución amortiguadora salino de citrato de sodio (SSC) ó de Tris. Las moléculas más pequeñas que el límite de exclusión de la columna será retenida por la columna.

C) Separación de proteínas por electroforesis SDS- PAGE

PREPARACION DE LAS MUESTRAS

Una vez polimerizado el gel concentrador se aplica la muestra.

Las muestras deben de contener una masa proteica en torno a 25-50 μg . Como todas las muestras tienen que tener la misma cantidad de proteína, se toma el volumen que se necesite de cada una de las proteínas problema.

Para ello, se toman X μL de la solución con la proteína problema y se añade 1:1 solución amortiguadora de muestra. Utilizar un tubo con X μL de patrones preteñidos de peso molecular conocido marca BioRad KaleidoscopeTM.

Mantener las muestras durante 5 minutos a 100 °C.

Retirar con cuidado el peine al gel y colocar los μL de muestra y colocar los geles en la cámara de electroforesis.

Llenar las cámaras de electroforesis que contienen los electrodos con solución amortiguadora de electroforesis, de modo que entre en contacto con ambos extremos del gel.

Conectar los cables de la cubeta a una fuente de corriente continua (comprobar la polaridad: rojo (+), negro (-)).

Aplicar 80 V hasta que el frente (visible por la banda azul de bromofenol) entre en el gel separador; después subir a 100 V.

Cuando el frente, se acerca al extremo inferior del gel, desconectar la corriente y sacar el sándwich .

Separar las placas de vidrio con ayuda de una espátula y sacar el gel (usar guantes para evitar tocar el gel con los dedos) con cuidado de no invertir su orientación.

Una vez finalizada la transferencia, se tiñe el gel de electroforesis mediante su inclusión en solución de tinción que contiene Azul de Coomassie, ácido acético, metanol toda la noche. Posteriormente, se pasa el gel a solución de decoloración que contiene ácido acético 10% y metanol 10% en agua, destiñendo el gel durante toda la noche.

14.1 Preparación de soluciones para electroforesis bidimensional (2-DE)

- Soluciones de corrida para isoelectroenfoque (IEF)

14.2 Solución concentrada amortiguadora IPG de rehidratación (8 M Urea, CHAPS 2% y Azul de bromofenol 0.02%)

Reactivo	Concentración final	Cantidad
Urea	8 M	12 g
CHAPS	2% (p/v)	0.5 g
Azul de bromofenol al 1%	0.02% (v/v)	50 µL
Agua destilada – desionizada (H ₂ O DDI)		c.b.p. 25 mL

*Esta solución puede almacenarse en alícuotas a -20°C hasta su uso.

*Antes de usar añadir 15 mM DTT (57.5 mg) y 0.5% (v/v) de solución amortiguadora IPG (125 µL por cada 25 mL).

14.3 Solución amortiguadora de equilibrio I (Tris 0.375 mM pH 8.8, Urea 6 M, Glicerol 20%, SDS 2%, Azul de bromofenol 0.02%)

Reactivo	Concentración final	Cantidad
Tris 0.375 mM pH 8.8	1.5 mM	2.5 mL
Urea	6M	3.6 g
Glicerol	30% (v/v)	3 mL
SDS	2% (p/v)	0.2 g
Azul de bromofenol al 1%	0.02% (p/v)	20 µL
Agua destilada – desionizada (H ₂ O DDI)		c.b.p. 10 mL

*Esta solución debe prepararse inmediatamente antes de su uso.

*Antes de usar añadir 130 mM DTT (200 mg/10 mL).

14.4 Solución amortiguadora de equilibrio I (Tris 0.375 mM pH 8.8, Urea 6 M, Glicerol 20%, SDS 2%, Azul de bromofenol 0.02%)

Reactivo	Concentración final	Cantidad
Tris 0.375 mM pH 8.8	1.5 mM	2.5 mL
Urea	6M	3.6 g
Glicerol	30% (v/v)	3 mL
SDS	2% (p/v)	0.2 g
Azul de bromofenol al 1%	0.02% (p/v)	20 μ L
Agua destilada – desionizada (H ₂ O DDI)		c.b.p. 10 mL

*Esta solución debe prepararse inmediatamente antes de su uso.

*Antes de usar añadir 135 Mm Iodoacetamida (250 mg/10 mL).

14.5 Solución concentrada de azul de bromofenol al 1%

Reactivo	Concentración final	Cantidad
Azul de bromofenol	1% (p/v)	100 mg
Tris-base	50 mM	60 mg
Agua destilada – desionizada (H ₂ O DDI)		c.b.p. 10 mL

- Soluciones para SDS-PAGE

14.6 SDS al 10%

Reactivo	Concentración final	Cantidad
SDS (PM 288.38)	10% (p/v)	10 g
Agua destilada – desionizada (H ₂ O DDI)		c.b.p. 100 mL

14.7 Persulfato de amonio (PSA) al 10%

Reactivo	Concentración final	Cantidad
Persulfato de amonio (PM 288.20)	10% (p/v)	0.1 g
Agua destilada – desionizada (H ₂ O DDI)		c.b.p. 1.0 mL

14.8 Solución de acrilamida/bisacrilamida al 30% (29:1)

Reactivo	Cantidad
Acrilamida	145 g
N, N'-bis-metilen-acrilamida (Bis acrilamida)	5 g
Agua destilada – desionizada (H ₂ O DDI)	c.b.p. 500 mL

*Filtrar y almacenar a 4°C en la oscuridad, 30 días máximo.

***Precaución:** la acrilamida es un potente neurotóxico, evitar la inhalación y el contacto directo con piel y mucosas. Se recomienda el uso de guantes durante su manejo.

14.9 Tris – HCl 1.5 M pH 8.8 (Solución amortiguadora baja)

Reactivo	Concentración final	Cantidad
Tris-base (PM 121.1)	1.5 M	181.65 g
Agua destilada – desionizada		750 mL
HCl 6N (PM 36.46)		Ajustar pH a 8.8
Agua destilada – desionizada (H ₂ O DDI)		c.b.p. 1 L

*Filtrar y almacenar a 4°C en la oscuridad, 30 días máximo.

14.10 Tris 0.5 M pH 6.8 (Solución amortiguadora superior)

Reactivo	Concentración final	Cantidad
Tris-base (PM 121.1)	0.5 M	60.55 g
Agua destilada – desionizada		750 mL
HCl 6N (PM 36.46)		Ajustar el pH a 6.8
Agua destilada – desionizada (H ₂ O DDI)		c.b.p. 1 L

*Filtrar y almacenar a 4°C en la oscuridad, 30 días máximo.

14.11 Solución amortiguadora de electroforesis (solución amortiguadora de corrida) (Tris 25 mM, Glicina 192 mM, SDS 0.1%) pH 8.3

Reactivo	Concentración final	Cantidad
Tris-base (PM 121.1)	25 mM	30.275 g
Glicina (PM 75.07)	192 mM	144.134 g
SDS (PM 288.38)	0.1% (p/v)	10 g
Agua destilada – desionizada (H ₂ O DDI)		c.b.p. 1 L

* Almacenar a 4°C hasta su uso. Si se observa precipitación de los componentes, almacenar a temperatura ambiente hasta su uso.

14.12 Gel de poliacrilamida desnaturalizante al 10% (gel separador) para tiras de IPG de 7 cm.

Reactivo	Cantidad
Acrilamida/Bis	7.5 mL
Solución amortiguadora bajo (Tris – HCl 1.5 M pH 8.8)	18 mL
H ₂ O DDI	3.96 mL
PSA	120 µL
TEMED	60 µL

*Adicionar cada reactivo en agitación constante para favorecer la polimerización.

14.13 Solución de sellado de las tiras de IPG

Reactivo	Concentración final	Cantidad
Solución amortiguadora de electroforesis	(Tris 25 mM, Glicina 192 mM, SDS 0.1%)	100 mL
Agarosa	0.5% (p/v)	0.5 g
Azul de bromofenol al 1%	0.02% (p/v)	200 µL

14.14 Solución de Azul de Coomassie R-250 (0.1% Azul de Coomassie R-250, 40% MeOH, 10% HOAc)

Reactivo	Concentración final	Cantidad
Azul de Coomassie R-250	0.1 % (p/v)	1.0 mg
MeOH	40% (v/v)	400 mL
HOAc	10% (v/v)	100 mL
H ₂ O DDI		c.b.p. 1 L

*Disolver el colorante en metanol, agregando el ácido acético y el agua destilada – desionizada, filtrar y proteger de la luz.

*Se recomienda el manejo de los reactivos de trabajo en campana de extracción para evitar contaminación del área de trabajo e intoxicación por inhalación.

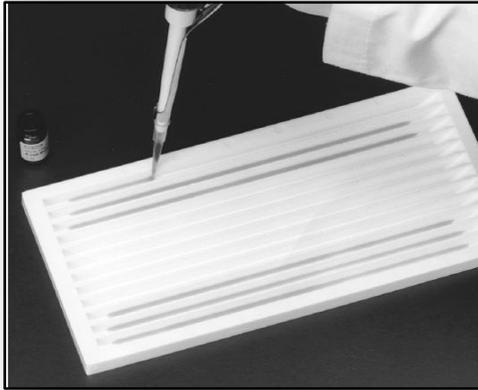
14.15 Solución de fijado y desteñido para tinción con Azul de Coomassie (40% MeOH, 10% HOAc)

Reactivo	Concentración final	Cantidad
Metanol	40% (v/v)	400 mL
Ácido acético	10% (v/v)	100 mL
Agua destilada – desionizada		c.b.p. 1 L

Primera etapa. Isoelectroenfoque (IEF)

D) Protocolo de rehidratación de las tiras de IPG

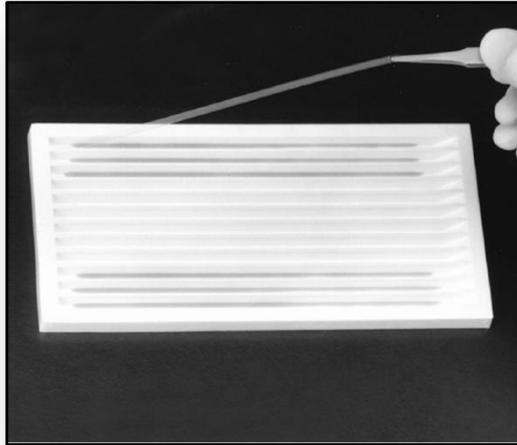
- a) Pipetear 125 μ L de cada muestra en los canales de la bandeja.



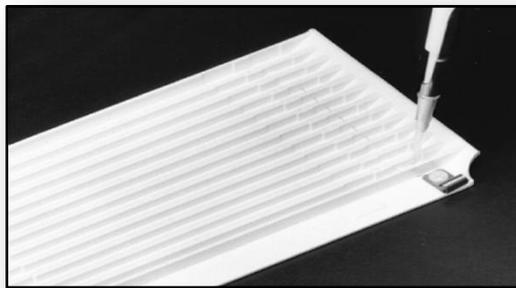
- b) Remover la cubierta protectora de las tiras de IPG empezando por el extremo ácido al básico, esto debido a que se previene el daño a la tira en el extremo básico, ya que es más sensible que el extremo ácido.



- c) La tira se coloca con la parte del gel hacia abajo, sumergiéndola en la muestra evitando la formación de burbujas.



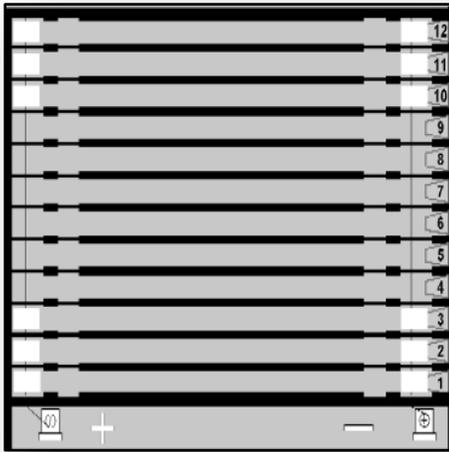
- d) Colocar 250 μ L de la solución de rehidratación sobre cada tira, procurando cubrirla por completo.



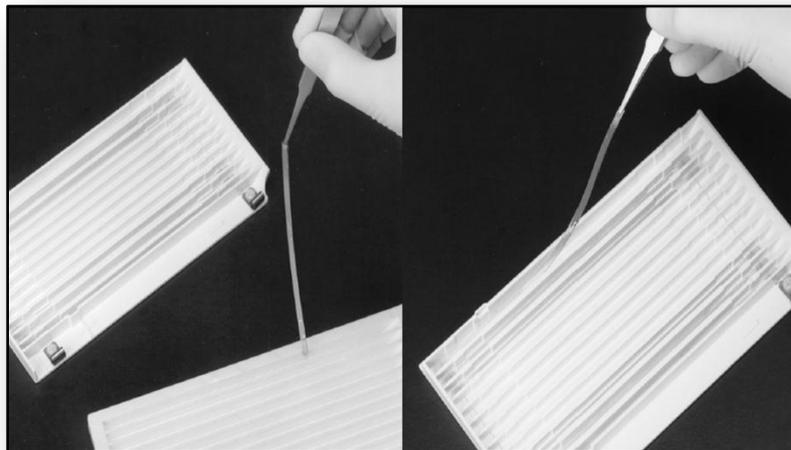
- e) Cubrir la tira con 2.5 mL de aceite mineral para minimizar la evaporación y cristalización de la urea.
- f) Llevar a cabo la rehidratación de las tiras durante un periodo de 14 – 16 horas durante toda la noche.

E) **Protocolo de corrida de IEF**

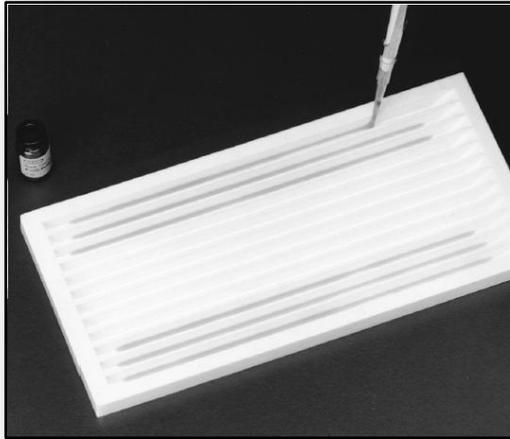
- a) Colocar la charola de cerámica en el equipo Protean® IEF Cell.
- b) Colocar esponjas de papel filtro en cada extremo de la tira previamente hidratada en 10 μ L de agua destilada.



- c) Transferir la tira de IPG con el gel de la tira orientado hacia arriba y la marca (+) impresa en la tira orientada hacia el ánodo.



- d) Cubrir cada carril con 2.5 mL de aceite mineral para evitar la evaporación de la muestra.



- e) Colocar los electrodos de manera que hagan contacto con las esponjas y la plataforma del equipo.
- f) Programar el corrimiento del IEF de acuerdo a las siguientes condiciones:

Condiciones de corrimiento de IEF para tiras de 7 cm, de acuerdo al INMEGEN

Paso	Voltaje máximo (V)	Modo de voltaje	Tiempo (hr)
1	100	Lineal	02:00
2	300	Lineal	00:40
3	1000	Lineal	00:27
4	5000	Lineal	01:20
5	5000	Lineal	00:15
Total	11400		4.42

Segunda etapa SDS-PAGE

F) Protocolo para la tinción de los geles SDS-PAGE con azul brillante de Coomassie R-250

- a) Transferir los geles a una bandeja de tinción y añadir una cantidad suficiente de azul brillante de Coomassie R-250 hasta cubrir completamente cada gel.
- b) Colocar la bandeja en agitación constante durante 1 hora.
- c) Retirar el colorante y agregar una cantidad suficiente de solución desteñidora (10% HOAc, 40% MeOH) hasta cubrir completamente cada gel.
- d) Cambiar la solución desteñidora varias veces para acelerar el proceso de decoloración.

G) Protocolo de inmunofluorescencia para influenza A

- a) Retirar sobrenadante del cultivo celular.
- b) Centrifugarlo a 1500rpm por 5 min.
- c) Lavar 2 veces con PBS
- d) Colocar la suspensión celular sobre el portaobjetos y dejar secar.
- e) Fijar con 40uL de alcohol/acetona 50%/50% fría.
- f) Colocar sobre cada pocillo de la lámina cubriendo el pozo, una gota con la solución de trabajo del anticuerpo monoclonal específico para el virus que se desea detectar y el control negativo (suero normal de ratón o PBS). Se debe evitar la contaminación entre pozos continuos.
- g) Incubar en cámara húmeda a 37° C por 30 minutos. La cámara debe estar suficientemente húmeda para evitar que la solución de anticuerpos monoclonales se seque en la lámina.
- h) Lavar la lámina con PBS pH 7.6, primero agregando en forma de chorro y luego lavar con PBS/tween y lavar por ultimo con PBS
- i) Eliminar el exceso de líquido. Los pocillos deben permanecer húmedos durante todo el proceso, no debe haber líquido entre los pocillos.

- j) Colocar una gota del conjugado anti-ratón IgG - FITC. El conjugado fluorescente no debe exponerse a la luz durante periodos prolongados.
- k) Incubar a 37° C por 30 minutos en cámara húmeda
- l) Lavar la lámina con PBS pH 7.6, primero agregando en forma de chorro y luego lavar con PBS/tween 20% y lavar por ultimo con PBS
- m) Eliminar el exceso de líquido y dejar secar al medio ambiente, protegido de la luz.
- n) Agregar isopropidio para teñir el núcleo celular.
- o) Agregar a la lámina la solución de montaje que contiene Tris, glicerina y amplificador de la fluorescencia
- p) Colocar la laminilla cubreobjetos evitando se formen burbujas de aire.
- q) Leer al microscopio de luz UV (Epifluorescencia) con objetivo de 40X y ocular de 10X longitud de emisión de onda 520 nm. La observación de las láminas deberá realizarse inmediatamente después de agregar la solución de montaje, en caso contrario guardar a -20°C