



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Química

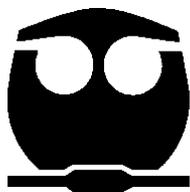
Estudio de la respuesta de anticuerpos en pacientes infectados por el virus de influenza A (H1N1) durante el periodo inicial de la pandemia abril-mayo 2009.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA

MARISOL PÉREZ TOLEDO



MÉXICO, D.F.

2010



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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: Constantino III Roberto López Macías
VOCAL: Profesor: Ruth Edith Martin Fuentes
SECRETARIO: Profesor: Laura Cecilia Bonifaz Alfonso
1er. SUPLENTE: Profesor: María de la Luz Ramírez Aguilar
2° SUPLENTE: Profesor: Cristina del Carmen Gil Cruz

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

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

ASESOR DEL TEMA: DR. CONSTANTINO III ROBERTO LÓPEZ MACÍAS

(nombre y firma)

SUPERVISOR TÉCNICO: DRA. CRISTINA DEL CARMEN GIL CRUZ

(nombre y firma)

SUSTENTANTE (S): MARISOL PÉREZ TOLEDO

(nombre (s) y firma (s))

DEDICATORIA

Este trabajo se lo dedico a mis padres, es gracias a ellos por los que estoy aquí.

A mis amigos, Kimberly y Ricardo, por haber soportado mis largas ausencias.

A mis amigos de la Facultad de Química, me divertí mucho con ustedes durante mi estancia en la Universidad.

A la Facultad de Química, que me enseñó lo que conozco ahora y de donde egreso orgullosamente.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Armando Isibasi Araujo, por haber permitido que me uniera a su grupo de trabajo.

Al Dr. Constantino III Roberto López Macías, por su dirección y consejos en la realización de este trabajo.

A la Dra. Laura Bonifaz Alfonzo y a la QFB Ruth Edith Martin Fuentes, por haber tomado parte de su tiempo para la revisión de este trabajo.

Al Dr. Haiko Nellen, Dr. Fernando Laredo Sánchez, Dr. José Malagón, al médico residente Fernando Lozano Patiño y al servicio de Medicina Interna del Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional Siglo XXI, así como a la Dra. Gabriela Rodríguez, jefa del servicio de Epidemiología del Hospital Regional General No. 1 "Dr. Carlos MacGregor" por su apoyo en el proyecto en conjunto.

A la Dra. Celia Alpuche Aranda y al Dr. José Alberto Díaz Quiñonez del InDRE, por habernos otorgado el permiso del uso de la cepa viral A/México/4482/2009(H1N1).

A la Dra. Clara Espitia Pinzón y al M. en C. Antonio Valecillo del Instituto de Investigaciones Biomédicas, por el préstamo de sus instalaciones P3.

Al Dr. Bernardo Lozano Dubernard, MVZ Horacio Lara Puente, y en especial al MVZ Francisco Quezada Monroy de AVI-MEX S.A. de C.V. por las facilidades otorgadas para el uso de las cepas porcinas y el préstamo de sus instalaciones.

A mis compañeros de la UIMIQ, especialmente a la Dra. Cristina Gil Cruz, al QFB Pablo Núriban Valero Pacheco, a la QFB Adriana Núñez Valencia y a la pQFB Esteban Domínguez Cerezo por su ayuda en los experimentos, consejos y recomendaciones en la escritura de este trabajo.

FINANCIAMIENTOS

Este proyecto fue aprobado por la Comisión Nacional de Investigación Científica del Instituto Mexicano del Seguro Social con el número 2010-785-002.

Este proyecto fue financiado por el Instituto de Ciencia y Tecnología del Distrito Federal (proyecto registrado en el Fondo de Investigación en Salud (FIS) del IMSS, con número: FIS/IMSS/PROT/714). Y por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), proyecto número SALUD- 2009-CO2-127068.

Agradezco también el apoyo recibido a través del proyecto FIS/IMSS/PROT/703 a cargo del Dr. Constantino López Macías.

CONTENIDO

1. ABREVIATURAS	7
2. RESUMEN	8
3. MARCO TEÓRICO	9
3.1. <i>Biología del virus de influenza A</i>	9
3.2. <i>Estructura del virus de influenza A</i>	9
3.3. <i>Estructura del genoma del virus de influenza A</i>	10
3.4. <i>Infección por el virus de influenza A</i>	11
3.5. <i>Respuesta inmune durante la infección por el virus de influenza A</i>	12
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	17
5. JUSTIFICACIÓN	18
6. HIPÓTESIS	19
7. OBJETIVO GENERAL	20
8. OBJETIVOS PARTICULARES	20
9. MATERIALES Y MÉTODOS	21
10.RESULTADOS	29
11.DISCUSIÓN	36
12.CONCLUSIONES	41
13.REFERENCIAS	42

1. ABREVIATURAS

A(H1N1) 2009	A/México/4482(H1N1) 2009
APC	Célula presentadora de antígeno
CDC	Centro para el Control y Prevención de Enfermedades
cDC	Célula dendrítica convencional
CMN S.XXI	Centro Médico Nacional Siglo XXI
DC	Célula dendrítica
DNA	Ácido desoxirribonucleico
H1N1/Iowa	Virus de influenza porcina A/Swine/Iowa/00239/2004(H1N1)
H3N2/Texas	Virus de influenza porcina A/Swine/Texas/4199-2/98(H3N2)
HA	Hemaglutinina
IFN	Interferón
IH	Inhibición de la hemoaglutinación
IL	Interleucina
IMSS	Instituto Mexicano del Seguro Social
InfA(H1N1)+	Influenza humana pandémica A(H1N1)2009 positivo
InfA(H1N1)-	Influenza humana pandémica A(H1N1) 2009 negativo
IP	Inhibidores de la propagación
MDA5	Gen asociado a diferenciación de melanoma 5
MHC	Complejo principal de histocompatibilidad
NA	Neuraminidasa
NK	Células asesinas naturales
NLR	Receptor tipo Nod
NP	Nucleoproteína
NS	Proteína no estructural
NV	Neutralizante de virus
OMS	Organización Mundial de la Salud
Pdc	Célula dendrítica plasmacitoide
PAMP	Patrón Molecular Asociado a Patógenos
PRR	Receptor de Reconocimiento de Patrón
RIG	Gene inducible por retinoides
RNA	Ácido ribonucleico
RNAv	Ácido ribonucleico viral
RSV	Virus sincicial respiratorio
rRT-PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa en Transcripción Reversa en tiempo real
SSA	Secretaría de Salud
SPF	Libre de Patógenos Específicos
Tc	Linfocito T citotóxico
TLR	Receptor tipo Toll
TNF	Factor de necrosis tumoral
UHA	Unidad Hemoaglutinante
VIA	Virus de Influenza A

2. RESUMEN

En abril de 2009, surgió una pandemia cuyo agente causal fue un virus de influenza A H1N1 de origen porcino con epicentro en México. La OMS la catalogó como la primera pandemia del siglo XXI. Hasta el 11 de enero de 2010, según información proporcionada por la Secretaría de Salud, se han reportado 69 071 casos confirmados y 896 defunciones en toda la república.

La genética de los virus de influenza permite que haya cambios antigénicos en su estructura, originando así virus con propiedades antigénicas diferentes, para los cuales los seres humanos no poseemos inmunidad previa. Se desconocen muchos aspectos del nuevo virus causante esta pandemia de influenza, incluyendo la respuesta inmune que se induce ante él. Es por esto que en el presente trabajo se evaluó la respuesta de anticuerpos en pacientes infectados con virus de influenza A (H1N1) durante el periodo 2009 de la pandemia. Esto se realizó a través de un estudio clínico longitudinal de casos y controles. El universo de trabajo fueron todos los pacientes con sospecha de infección por virus de la influenza humana que ingresaron al área de hospitalización del servicio de Medicina Interna del Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional Siglo XXI y del Hospital General "Dr. Carlos MacGregor Sánchez Navarro" del IMSS en el Distrito Federal, durante el periodo comprendido del 30 de abril al 6 de diciembre del año 2009. Se encontró que estos pacientes presentaron títulos detectables de anticuerpos contra el virus de influenza pandémico A/México/4482/2009, mientras que en los individuos sanos no se detectaron títulos. Por otra parte, los mismos pacientes e individuos sanos presentaron títulos de anticuerpos contra otras cepas de influenza porcinas A H1N1/Iowa y H3N2/Texas, no encontrándose diferencia en los títulos contra estos virus en ambos grupos. Estos resultados indican que los anticuerpos detectados en los pacientes podrían estar participando en la resolución de la enfermedad, y que a pesar de que los títulos contra estos virus son altos, así como la identidad entre las cepas porcina H1N1/Iowa y A(H1N1) 2009, estos anticuerpos no fueron protectores contra la infección.

3. MARCO TEÓRICO

3.1. Biología del virus de influenza A.

La influenza es una enfermedad muy común con grados variables de mortalidad [1]. El agente etiológico es el virus de influenza, el cual infecta células epiteliales del tracto respiratorio. Existen tres tipos de virus de influenza: A, B y C. Los tres pertenecen a la familia *Orthomyxoviridae*. Sin embargo, sólo los tipos A y B son patógenos para el humano[2].

El virus de influenza A es el más importante de todos, ya que causa epidemias anuales y pandemias en intervalos irregulares. Existen muchos subtipos de virus y se clasifican en función de sus proteínas de superficie, la hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (NA), las cuales se enumeran en función de las relaciones antigénicas que existen entre ellas. Hasta la fecha, se han encontrado 16 tipos de HA y 9 tipos de NA. La nomenclatura estándar de los virus de influenza se construyen con el tipo de virus; la especie en la cual fue aislado (sólo si no es humano); lugar geográfico en el cual fue aislado, número de aislamiento, año de aislamiento y, sólo para los virus de influenza, el subtipo de HA y NA, por ejemplo, A/California/04/2009[3].

3.2. Estructura del virus de influenza A.

La forma de los virus de influenza es pleomórfica, y miden desde 100 nm en la estructura esférica, hasta 300 nm en su estructura filamentosa. El virión de influenza A proyecta espigas de HA y NA, a través de una membrana lipídica proveniente de la célula del hospedador. Una pequeña cantidad de canales iónicos M2 atraviesan la envoltura de membrana. Debajo se encuentra la proteína M1, la cual forma una matriz que encierra el núcleo del virion. Dentro de esta matriz, se encuentran la proteína de exportación nuclear (Nuclear Export Protein, NEP o NS2) y el complejo de ribonucleoproteína (RNP), el cual consiste en segmentos de RNA viral cubiertos con nucleoproteína (NP). También se encuentra la RNA polimerasa heterotrimérica dependiente de RNA, la cual está compuesta por tres subunidades, una ácida (PA) y dos básicas (PB1 y PB2). La estructura del virus se esquematiza en la figura 1.

3.3. Estructura del genoma del virus de influenza A.

El genoma del virus de influenza A está compuesto por ocho segmentos de RNA viral antisentido de cadena sencilla. Los segmentos 1, 3, 4 y 5 codifican exclusivamente para una sola proteína: PB2, PA, HA, y NP, respectivamente. En todos los virus de influenza, la proteína PB1 es codificada por el fragmento 2, sin embargo, en algunas cepas de influenza A, éste segmento también codifica a una proteína accesoria llamada PB1-F2, que tiene actividad pro-apoptótica, y que se genera por un marco de lectura alterno en +1. El segmento 6 codifica para la proteína NA, el segmento 7 genera a la proteína de matriz M1, y por splicing alternativo, a la proteína de matriz M2. A partir del segmento 8, el virus de influenza A expresa la proteína antagonista de interferón, NS1, y por splicing alternativo del RNA mensajero, la proteína de exportación nuclear, la cual está involucrada en la exportación del complejo de ribonucleoproteína del núcleo de la célula huésped. Los extremos de cada segmento de RNAv forman una horquilla helicoidal, el cual es unido por el complejo heterotrimérico de RNA polimerasa, mientras el resto del segmento está cubierto con proteína nuclear, la cual es rica en arginina[4].

Los anticuerpos neutralizantes que se generan contra los sitios antigénicos de la HA favorece que se acumulen mutaciones puntuales en estos sitios, originando nuevas cepas con variaciones antigénicas que están relacionadas a las cepas circulantes durante epidemias previas[1]. A este evento se le conoce como cambio o "drift" antigénico y permite la evasión de la respuesta inmune por parte del virus.

Por otra parte, el genoma segmentado del virus de influenza permite cambios antigénicos radicales (*antigenic shift*), en el cual una cepa de virus de influenza A adquiere el segmento de HA, y probablemente de NA, proveniente de un virus de influenza de diferente subtipo. Esta recombinación puede ocurrir en células infectadas con diferentes virus, animales y humanos. El resultado es un virus que codifica proteínas antigénicas[5] completamente nuevas, contra las cuales no existe inmunidad previa en los humanos y la reactividad cruzada de los anticuerpos contra cepas relacionadas es casi nula. Así es como surgen las

con la unión de la HA0 a los receptores celulares con ácido siálico en su superficie. Esto inicia la endocitosis y posterior formación del endosoma. En el proceso, los monómeros HA0 se asocian no covalentemente para formar homotrímeros. La escisión de la proteína HA0 por proteasas celulares forma dos subunidades, HA1 y HA2, lo que también provoca la exposición del péptido de Fusión (F) de HA2 en el extremo N-terminal. El bajo pH dentro del endosoma activa cambios conformacionales en HA2, formando estructuras parecidas a horquillas, las cuales jalen las membranas virales y celulares y las fusionan[2]. Esto permite que las RNPs virales sean liberadas hacia el citoplasma de la célula. Esta liberación está precedida por la acidificación interna del virus, que ocurre porque los protones del endosoma son transportadas al interior del virus por el canal iónico que forma la proteína M2. Esto deshace las interacciones entre proteínas, permitiendo el proceso de liberación de las RNPs virales [9]. El RNA y las proteínas responsables de la replicación entran al núcleo de la célula huésped dando lugar a la replicación de los segmentos y a la producción de las diferentes proteínas en los ribosomas. Luego se produce el ensamblaje y la liberación de nuevos virus por gemación y lisis de las células infectadas. La NA hidroliza los residuos de ácido siálico presente en glicoconjugados celulares interviniendo en el proceso de liberación de las partículas virales y favoreciendo su diseminación[1, 10].

3.5. *Respuesta inmune durante la infección con virus de influenza A.*

Como se mencionó antes, el VIA debe fusionarse con la membrana celular, para poder entrar a la célula y secuestrar la maquinaria genética para poder llevar a cabo su reproducción. Es aquí cuando el virus interactúa con la respuesta inmune del hospedero[11]. El sistema inmune innato es la primera defensa que el virus activa cuando se encuentra dentro del hospedero. Cuando ésta se inicia, se secretan citocinas y quimiocinas como parte de la respuesta inmune inflamatoria, las cuales atraen a otras células, como neutrófilos, al sitio de la infección. Entre las citocinas que son inducidas, los interferones tipo I representan el mecanismo de

respuesta inmune innata más efectivo contra la replicación y propagación del VIA[12-14].

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

El primer grupo corresponde a los TLRs. Estos receptores poseen un dominio extracelular, con repeticiones ricas en leucina con función de reconocimiento de ligando, un dominio transmembranal y un dominio intracitoplásmico, para la transducción de señales[15]. De estos, los TLRs 3, 7 y 8 son los más importantes durante el reconocimiento del virus. El TLR3 reconoce RNA de doble cadena, los cuales pueden formarse en algún momento durante el ciclo replicativo del virus en el interior de la célula, mientras que los TLR7 y TLR8, reconocen secuencias de RNA de cadena sencilla ricas en uridina, como las que forman parte del genoma del VIA[16].

Las helicasas de RNA, el gen inducible por ácido retinoico-I (RIG-I) y el gen asociado a diferenciación de melanoma 5 (MDA5)[17], también son PRRs que forman parte del sistema de reconocimiento del VIA[18]. La señalización a través de estos receptores deriva en la unión del factor de transcripción IRF-3 a su correspondiente sitio de unión en la región promotora del gen de IFN β e inicia su expresión posterior a la infección con VIA[19]. El IFN β secretado activa al receptor de interferon tipo I en la misma célula que lo secreta e induce la activación de IFN α [20].

La familia de NLRs (Nod-like receptors) se caracterizan por su capacidad de formar plataformas moleculares centrales, como lo inflamasomas, que permiten la activación de caspasas. En especial, el complejo NLRP3 forma un inflamasoma

activador de caspasa-1, la cual es capaz de procesar y activar a las pro-IL-1 β , pro-IL-18 y pro-IL-33, produciendo IL-1 β , IL-18 e IL-33, regulando así la respuesta inflamatoria[21].

La secreción de interferones tipo I no sólo induce la transcripción de genes con actividad antiviral, sino que también activan a células dendríticas[22-24] y otras células del sistema inmune, activando a la respuesta inmune adaptativa.

A pesar de que existe una serie de componentes de la respuesta innata que intervienen en la resolución de la infección por virus de influenza en individuos inmunocompetentes, muchos autores consideran de gran importancia la participación de la respuesta inmune adaptativa mediada por linfocitos T citotóxicos (Tc), ya que se ha demostrado que la resolución de la infección corresponde con un incremento en la respuesta de linfocitos Tc, y que dicha respuesta puede detectarse en los pulmones del individuo infectado. Sin embargo, también se ha demostrado que la sola inducción de esta respuesta no es suficiente para la resolución completa de la enfermedad, ya que varios estudios clínicos y ensayos de laboratorios también han determinado que la respuesta inmunitaria mediada por anticuerpos es de gran importancia en la resolución de la infección por virus de influenza[25].

En humanos, los anticuerpos contra VIA se pueden observar tanto en suero como en las secreciones respiratorias, de 3 a 5 días después de la infección primaria. Se ha observado que la cinética de la respuesta de anticuerpos es consistente con la participación en la resolución de la enfermedad en el hospedero inmunocompetente[26-27]. Estos anticuerpos se encuentran en vía sistémica en el suero, debido a las células plasmáticas en los nódulos linfáticos, los cuales son detectables en estos órganos a partir del día 4 a 5 después de la infección[28]. También pueden encontrarse localmente cuando el virus es reconocido por las células presentadoras de antígeno de la submucosa de las vías aéreas, donde son detectables en tejido asociado a tracto respiratorio de 5-7 días después de la infección y alcanzan su pico entre los días 10 y 20. Se cree que estos anticuerpos pueden contribuir al control de la infección después de su transcitosis al espacio

intersticial extravascular del tracto respiratorio por transporte activo a través de la membrana basal de las células epiteliales mediado por receptores poliméricos de inmunoglobulinas (pIgR)[29-30].

La protección mediada por anticuerpos se atribuye principalmente a aquellos que van dirigidos contra la hemaglutinina (HA). Se ha descrito que la inmunidad mediada por anticuerpos dirigidos contra la neuroaminidasa (NA) es más débil, y aunque no previene la infección como es el caso de los anticuerpos anti HA, puede suprimir la replicación y por lo tanto reduce la morbilidad y la mortalidad[31].

El control de la infección mediada por anticuerpos puede funcionar por dos mecanismos: impidiendo la diseminación del virus y evitando su capacidad de infectar otras células del hospedero o impidiendo la maduración y la liberación de nuevos viriones a partir de las células infectadas. Los anticuerpos que actúan de la primera forma se conocen como neutralizantes, pues tienen la capacidad de neutralizar al virus (NV), mientras que los que median el segundo mecanismo de acción se conocen como inhibidores de la propagación (IP). La actividad NV es mediada por anticuerpos específicos para HA que previenen la unión a la célula hospedera o la fusión intraendosomal. Para esto, los anticuerpos deben unirse a las determinantes antigénicas alrededor del sitio de unión de la HA. La actividad de estos anticuerpos suelen medirse mediante la prueba de inhibición de la hemoaglutinación (IH). Los anticuerpos que se unen a sitios membranalmente proximales al sitio de unión al ácido siálico muchas veces muestran muy poca o ninguna actividad en las pruebas de IH. Sin embargo estos anticuerpos pueden mostrar aún así capacidad neutralizante, al inhibir la fusión intraendosomal[25].

Por otro lado los anticuerpos que muestran actividad IP, ejercen su función durante el proceso del ensamblaje del virus en la membrana plasmática. Las proteínas virales transmembranales se acumulan en parches, de donde han sido desplazadas las proteínas transmembranales endógenas, y se van formando los viriones. El reconocimiento de estas proteínas por anticuerpos específicos produce una reducción en la liberación de los viriones. Una vez que la respuesta inmune de

anticuerpos ha generado células B de memoria específicas, es de larga duración[32].

La importancia de la respuesta de anticuerpos en la resolución de la infección por virus de influenza puede apreciarse en el modelo del ratón, en el cual se ha visto que durante la infección primaria la recuperación no ocurre en ausencia de la respuesta de anticuerpos. En este estudio se detectó que existen dos fases en la respuesta inmune. Una primera fase temprana caracterizada por un decremento rápido en el título viral dependiente de linfocitos T, y una segunda fase tardía más prolongada dependiente de linfocitos B. Los ratones deficientes de linfocitos B mostraron un curso bifásico de la infección con un decremento inicial del título viral durante la primera fase, la cual fue seguida por un aumento paulatino durante la segunda fase hasta que la muerte ocurrió[33].

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En los meses de abril-mayo de 2009 se desencadenó una epidemia de influenza en México. El agente etiológico de la presente epidemia es un virus de influenza no detectado antes que contiene genes de influenza aviar y porcina denominado virus de la influenza humana pandémica A(H1N1) 2009. En México, hasta el 4 de enero de 2009 se han reportado 68 548 casos confirmados y 867 defunciones. La mortalidad producida por este virus en México es particularmente alta comparada con la observada en Estados Unidos. No se conocen las características de la respuesta de anticuerpos en contra del virus A(H1N1) 2009 durante el curso de la infección, y si estos tienen algún papel en la resolución de la misma. Por lo cual en este estudio se evaluó esta respuesta en pacientes infectados con el virus de influenza humana pandémica A(H1N1) 2009 y en individuos sanos con ausencia de infección, con el fin de estudiar la capacidad inmunogénica del virus y la respuesta humoral, así como el posible papel protector de los anticuerpos contra el virus pandémico durante el curso de la infección. También se buscó si la previa exposición con otros virus de influenza generó una respuesta de anticuerpos de reactividad cruzada contra el nuevo virus pandémico.

4. JUSTIFICACIÓN

En la historia de la humanidad se han registrado diferentes pandemias ocasionadas por variantes de virus de la influenza, siendo la de 1918 la más letal, provocando alrededor de 40 millones de muertes, seguida por la de 1957 en Asia y en 1968 en Hong Kong. Actualmente se ha desencadenado una pandemia causada por el virus de influenza humana A(H1N1), que inició en México y en donde ocupamos el segundo lugar mundial en número de muertes. Se sabe de otras pandemias que este tipo de enfermedades presentan incrementos abruptos de mortalidad y morbilidad de forma estacional y luego ceden para reaparecer meses después, este comportamiento se presenta a lo largo de tres años. Ya que el agente causal de esta pandemia es un virus de influenza A con propiedades antigénicas para las cuales no existe inmunidad preexistente en humanos, y considerando los antecedentes de pandemias previas las cuales tuvieron consecuencias graves, es importante conocer la capacidad inmunogénica del virus así como la capacidad del organismo de generar inmunidad, medida a través de la inducción de anticuerpos, en pacientes durante el curso de la infección y descubrir el papel de estos en la resolución de la enfermedad. También es importante determinar si la exposición previa con otros virus de influenza genera protección cruzada contra el nuevo virus pandémico.

5. HIPÓTESIS

Él virus de influenza A/México/4482/2009(H1N1) es altamente inmunogénico y generará altos títulos de anticuerpos específicos. La exposición previa con otros virus de influenza generó una respuesta de anticuerpos cruzada de baja magnitud contra el nuevo virus pandémico.

6. OBJETIVO GENERAL

Analizar la respuesta de anticuerpos contra el virus de influenza humana A/México/4482/2009(H1N1) y determinar si la exposición previa con otros virus de influenza generó anticuerpos de reacción cruzada con capacidad protectora en pacientes infectados durante el brote epidémico de influenza A(H1N1) en el periodo abril-mayo de 2009, cuya infección fue confirmada por RT-PCR en tiempo real, así como en individuos sanos que no presentaron la infección.

7. OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinar el título de anticuerpos contra las cepas de virus de influenza A/México/4482/2009(H1N1), A/Swine/Iowa/00239/2004(H1N1) y A/Swine/Texas/4199-2/98(H3N2) en el suero de pacientes con infección de influenza A(H1N1) 2009 confirmada por RT-PCR en tiempo real (rRT-PCR) como positivos o negativos, y en sueros control de individuos sanos empleando la técnica de inhibición de la hemoaglutinación.
- Identificar las posibles diferencias antigénicas entre las hemaglutininas de las cepas de influenza A/México/4482/2009 y A/California/04/2009 a través de un alineamiento de secuencias.
- Predecir los epitopos para linfocitos B presentes en la hemaglutinina de las cepas porcinas A/Swine/Iowa/00239/2004(H1N1) y A/Swine/Texas/4199-2/98(H3N2).
- Comparar los epitopos predichos del virus porcino H1N1/Iowa contra la cepa A/México/4482/2009(H1N1), y del virus porcino H3N2/Texas contra la cepa vacunal estacional del periodo 2008-2009 A/Brisbane/10/2007(H3N2).

9. MATERIALES Y MÉTODOS.

9.1. Diseño general del estudio.

9.1.1 Diseño del estudio clínico: Estudio de casos y controles, observacional, longitudinal.

9.1.2. Universo de Trabajo:

- a. Casos: Todos los pacientes con sospecha de infección por virus de la influenza humana que sean ingresados en el área de hospitalización del servicio de Medicina Interna del Hospital de Especialidades del CMN Siglo XXI y del Hospital General "Dr. Carlos MacGregor Sánchez Navarro" del IMSS del 30 de abril al 6 de diciembre de 2009.
- b. Controles: Personas sin datos de infección en un rango de edad de 18 a 60 años.
- c. Tamaño de la muestra: Se realizó un muestreo No Probabilístico de Casos Consecutivos, utilizando la incidencia del presente brote de 5,117 casos confirmados y considerando la población actual de México de 105,000,000 de habitantes, nos da una incidencia de 0.00004%, lo cual al utilizar la fórmula general para variables cualitativas en estudios observacionales $N = 4Z\alpha^2 P(1-P)/W^2$, nos da un tamaño de muestra de por lo menos 37 pacientes por grupo

9.1.3. Criterios de Selección de la muestra:

9.1.3.1. Criterios de Inclusión:

- Pacientes de cualquier edad.
- Cualquier sexo.
- Con sospecha clínica de infección por el virus de la influenza humana en base a los siguientes criterios: Inicio súbito del cuadro clínico durante los 7 días previos a su ingreso, con 2 o más de los siguientes síntomas: fiebre mayor a 39 °C de causa no explicada, cefalea intensa, mialgias, odinofagia, rinorrea, letargo, dificultad respiratoria, náusea, vómito y/o diarrea.
- Prueba rápida para influenza A.

9.1.3.2. Criterios de No Inclusión:

- Identificación de otra causa de los síntomas diferente a la infección por virus de la influenza humana, incluyendo cualquier infección viral o bacteriana y a cualquier nivel, al momento del ingreso del paciente.

9.1.3.3. Criterios de Exclusión:

- Identificación de otra causa de los síntomas diferente a la infección por virus de la influenza humana, incluyendo cualquier infección viral o bacteriana y a cualquier nivel en cualquier momento durante la hospitalización.

9.1.4. Variables.

9.1.4.1. Variables de estudio:

- a) Diagnóstico de infección por virus de la influenza humana por rRT-PCR.
- b) Título de anticuerpos contra virus de influenza A/México/4482/2009(H1N1), A/Swine/Iowa/00239/2004(H1N1) y A/Swine/Texas/4199-2/98(H3N2).

9.1.4.2. Variables de respuesta:

- a) Título de anticuerpos contra virus de influenza A/México/4482/2009(H1N1), A/Swine/Iowa/00239/2004(H1N1) y A/Swine/Texas/4199-2/98(H3N2).

9.1.4.3. Variables de control:

- a) En el caso de pacientes, diagnóstico confirmatorio de infección por virus de influenza A(H1N1) 2009 por rRT-PCR, positivo o negativo.
- b) En el caso de controles, ausencia síntomas de resfriado indicadores de infección previa o en curso.

9.1.4.4. Variables demográficas:

- a) Edad. Variable cuantitativa continua que se expresa en años-calendario.
- b) Sexo. Variable cuantitativa nominal que se expresa como femenino o masculino.

9.2. Alineamiento de secuencias.

Dado que se contaba con la cepa de virus de influenza A/México/4482/2009(H1N1), se procedió a realizar un análisis de secuencias entre la hemaglutinina de esta cepa con la cepa de referencia A/California/04/2009(H1N1) para evaluar si la identidad entre ellas era alta, de tal manera que se pudiera emplear la cepa A/México/4482/2009(H1N1) en la determinación de anticuerpos. Para esto, se accedió a la base de datos Protein del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (National Center for Biotechnology Information) en el portal www.ncbi.nlm.nih.gov/protein y se descargaron las secuencias FASTA de aminoácidos correspondientes a las hemaglutininas de ambas cepas.

El análisis de secuencias lineal se realizó empleando el software MUSCLE v3.7 empleando el servidor en línea desde www.ebi.ac.uk/Tools/Muscle[34]. Las estructuras tridimensionales se ordenaron al servidor ModWeb[35], con las cuales se realizó un alineamiento por pares de la estructura tridimensional proteica empleando la herramienta DaliLite.

9.3. Predicción y análisis de conservación de epitopos en las cepas de virus de influenza porcinas A/Swine/Iowa/00239/2004(H1N1) y A/Swine/Texas/4199-2/98(H3N2).

Se accedió a la base de datos Protein del NCBI en el portal www.ncbi.nlm.nih.gov/protein y se descargaron las secuencias FASTA de aminoácidos correspondientes a las hemaglutininas de ambas cepas. Las estructuras tridimensionales se ordenaron al servidor ModWeb. Con las estructuras, se accedió a la Base de Datos de Epitopos y Recursos de Análisis[36] (Immune Epitope Data Base and Analysis Resource) en la página web www.immuneepitope.org y se predijeron los epitopos empleando la herramienta de predicción de epitopos en linfocitos B llamada ElliPro[37]. Las secuencias de los epitopos lineales fueron introducidas en la herramienta de Análisis de

Conservación de Epitopos de la misma base de datos, comparándolos con la secuencia de aminoácidos de la hemaglutinina de la cepa A/México/4482/2009(H1N1) en el caso del virus porcino H1N1/Iowa, y con la cepa vacunal estacional A/Brisbane/10/2007(H3N2), en el caso del virus porcino H3N2/Texas[34, 37-38]. En todo el documento, me referiré a la cepa A/Swine/Iowa/00239/2004(H1N1) como virus porcino H1N1/Iowa, y a la cepa A/Swine/Texas/4199-2/98(H3N2) como virus porcino H3N2/Texas.

9.4. Obtención y procesamiento de las muestras.

De los pacientes que cumplieron con los criterios de inclusión y de los controles, se obtuvo una muestra a su ingreso, correspondiente a 5 mL de sangre en un tubo sin aditivos para separación de suero. El manejo de estas muestras biológicas se realizó de acuerdo a lo descrito en el Manual de Bioseguridad de la UIMIQ, para lo cual, se cuenta con un área con nivel de bioseguridad 2 plus, donde las muestras se procesaron, se alicuotaron y criopreservaron a -70 °C hasta su análisis.

9.5. Propagación y crecimiento del virus de influenza A/México/4482/2009 en embriones de pollo.

9.5.1. Obtención del cultivo semilla.

Para evitar el cambio antigénico inducido por la siembra consecutiva del mismo virus, se procedió a realizar primero un cultivo semilla del virus. Para esto, se emplearon embriones de pollo grado SPF (*Specific Pathogen Free*, Libres de Patógenos Específicos) de 4 días de edad. Primero, se realizó una ovoscopia para establecer el sitio de inoculación del virus. Posteriormente se desinfectó el sitio de inoculación con solución de yodo-povidona al 10% y se agujereó el cascarón empleando una aguja calibre 18G. Los embriones se inocularon con 100 µL ó 200 µL de suspensión viral inicial. Los embriones inoculados se incubaron a 37 °C durante 72 horas. Al término de este tiempo, los embriones se refrigeraron a 4°C durante 4 horas y se procedió a la cosecha del virus. Para esto, se retiró la parte apical de cada uno de los huevos con una tijera y se retiró el líquido alantoides. Todo el líquido se colectó en un tubo estéril de 50 mL. Por centrifugación, se

separaron las células remanentes provenientes del embrión, y finalmente el volumen final de líquido alantoides se repartió en alícuotas en tubos para criopreservación. Todo el procedimiento implicado con el uso del virus no inactivado se realizó en una habitación con nivel de bioseguridad 3, en las instalaciones del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM a cargo de la D5ra. Clara Espitia Pinzón.

9.5.2. Propagación del virus.

Para obtener el antígeno a emplear en las pruebas para determinar el título de anticuerpos contra el virus, se realizó el mismo procedimiento descrito anteriormente, partiendo de una alícuota de 4 mL obtenida del cultivo semilla.

Los virus porcinos A/Swine/Iowa/00239/2004(H1N1) y A/Swine/Texas/4199-2/98(H3N2) fueron proporcionados por la empresa Avi-mex S.A. de C.V. Los lotes de virus fueron propagados en embriones de pollo grado SPF de la misma forma en la que se realizó con el virus A/México/4482/2009(H1N1). Los virus porcinos, tanto para la titulación del antígeno como durante el ensayo, se manipularon siguiendo las Buenas Prácticas de Laboratorio en las instalaciones del departamento de investigación en línea porcícola la empresa.

9.6. Determinación del título de anticuerpos contra el virus de influenza A/México/4482/2009(H1N1), A/Swine/Iowa/00239/2004(H1N1) y A/Swine/Texas/4199-2/98(H3N2) por inhibición de la hemoaglutinación.

9.6.1. Inactivación y adsorción de los sueros.

Con el fin de evitar lecturas inespecíficas en el ensayo por proteínas del complemento y hemaglutininas inespecíficas presentes en el suero, se realizó un tratamiento previo a la muestra. Para esto, se colocaron 50 µL de suero de cada uno de los pacientes y controles en una placa de 96 pozos para cultivo celular. Esta placa se protegió con una cubierta adherente y se calentó a 56 °C durante 30 minutos en un baño maría. Posteriormente, se agregaron 100 µL de suspensión de caolín y 100 µL de eritrocitos de ave al 5%. La placa se almacenó toda la noche

a 4 °C. Finalmente, la placa se centrifugó a 2 500 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante obtenido en cada pozo fue empleado para el ensayo.

9.6.2. Titulación del antígeno

Para iniciar con la técnica de inhibición de la hemoaglutinación, primero se tituló el virus (antígeno) a emplear. Para esto se colocaron 50 µL de diluyente para el antígeno (PBS) en cada uno de los 12 pozos en 4 filas (A, B, C y D) de una microplaca de poliestireno con pozos con fondo en forma de “U”. Posteriormente se agregó 50 µL de antígeno en el pozo de las primeras tres filas. Se realizaron diluciones logarítmicas base 2 seriadas de 1:2 a 1:4096 del antígeno, homogeneizando el contenido del pozo por lo menos 6 veces. Se agregó 50 µL de la suspensión de eritrocitos de pollo al 0.5 % en PBS a cada pozo, se agitó, se cubrió la microplaca y se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos. A la última fila de pozos no se le agregó antígeno, por lo que funcionó como control de eritrocitos. Se interpretó el resultado considerando la presencia o ausencia de hemoaglutinación. El punto final de la titulación de antígeno se consideró como la dilución más alta del antígeno en la que se observe 100% de hemoaglutinación (Figura 2).

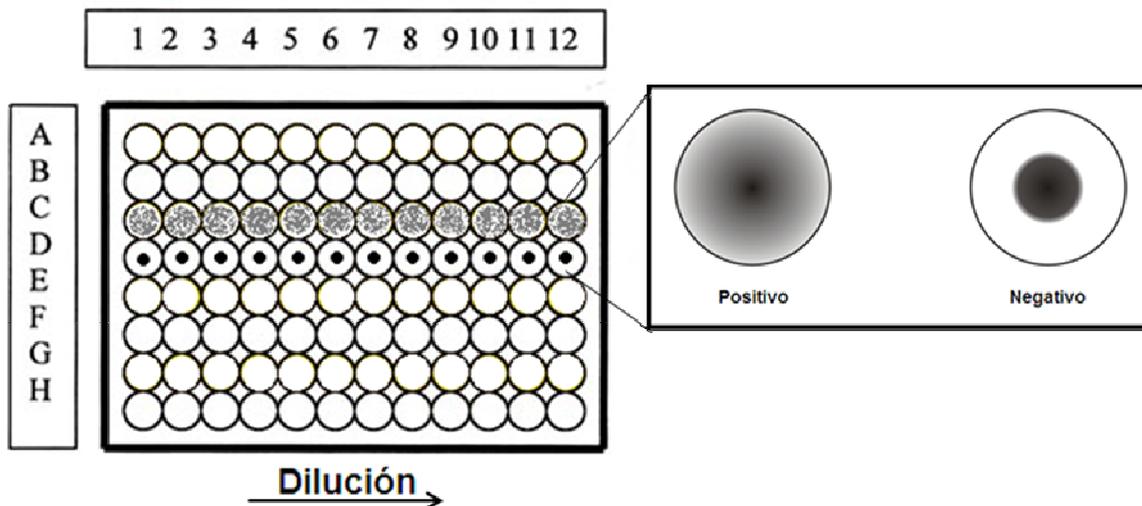


Figura 1. Esquema de la técnica de inhibición de la hemoaglutinación. Se muestra a detalle cómo se observa en el pozo un resultado positivo y uno negativo.

9.6.3. Titulación de los sueros.

Se colocaron 50 μ L de PBS en una microplaca con pozos con fondo "U". Se añadieron 50 μ L de cada una de las muestras de suero en la columna A, en el orden en que las muestras fueron identificadas. También se incluyó un control de eritrocitos agregando sólo 50 μ L de eritrocitos al 0.5% en una fila completa, en cada una de las placas. Se mezclaron y se hicieron diluciones dobles seriadas de 1:10 hasta 1:20480. Posteriormente, se agregaron 50 μ L de antígeno, previamente ajustado a 8 UHA (Unidades Hemoaglutinantes) en 50 μ L. Se cubrió la placa, se agitó y se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se agregaron 50 μ L de suspensión de eritrocitos al 0.5% en cada uno de los pozos. De nuevo, se cubrió la placa, se agitó suavemente y se incubó a temperatura ambiente de 30 a 45 minutos, hasta que la sedimentación en el control de eritrocitos se observara bien delimitada. Se leyeron los resultados considerando positivo los pozos con un aspecto similar al control de eritrocitos, ya que ocurrió una reacción de inhibición de la hemoaglutinación.

9.7. *Análisis estadístico.*

Debido a que los resultados de los títulos se encuentran expresados en base logarítmica, se aplicó el cálculo de media geométrica (MG). Para fines de éste cálculo, aquellas muestras cuyos títulos se detectaran como 0 en el ensayo, se les asignó la mitad de la mínima dilución, es decir, 5. El análisis estadístico se realizó aplicando una prueba de ANOVA no paramétrica y se confirmó con la prueba de Mann-Whitney.

9.8. *Consideraciones éticas.*

El protocolo, del cual este trabajo forma parte, se apegó a los estándares éticos internacionales establecidos en Helsinki y modificados en Tokio[39] y se desarrolló siguiendo los lineamientos de las Buenas Prácticas Clínicas[40]. El proyecto fue aprobado por la Comisión Nacional de Investigación Científica del IMSS proyecto número; 2010-785-002. De acuerdo con las recomendaciones del Comité de Ética,

se eliminó la carta de consentimiento informado y se sustituyó por un guión que fue leído a los participantes al momento de la invitación. De todos los pacientes reclutados se realizó la lectura del siguiente guión:

“Sr.(Sra.) mi nombre es _____, soy médico (adscrito o residente) del servicio de medicina interna. Junto con la unidad de Investigación Médica en Inmunoquímica, estamos determinando si los pacientes que presentan esta infección por el virus de influenza humana tipo A (H1N1) mejoran más rápido o no, dependiendo de si en su sangre tienen anticuerpos contra el virus estacional o el de la vacuna, si tienen más moléculas que favorecen la inflamación y si sus células de defensa están más o menos activadas. Hasta el momento esto no se sabe y establecerlo puede ayudar en un futuro para que los médicos puedan atender mejor a los pacientes e incluso se podría contar con marcadores que puedan servir para diagnosticar tempranamente a los pacientes que se van a complicar. Su participación consiste en que le podamos tomar una muestra de sangre de su brazo (2 tubos pequeños, uno de 5 y otro de 7 mL). Las molestias son como cualquiera de cuando le toman sangre, como dolor o un moreton. Sí Ud. decide no participar con nosotros, no cambia en nada la atención que el IMSS le da, ni tampoco su tratamiento cambia si decide participar o no”

10. RESULTADOS

10.1. Muestra de estudio.

La muestra de estudio consistió en 34 pacientes, diecinueve hombres y quince mujeres. La edad de los pacientes se encontró en el rango de 3 a 78 años. Todos presentaron algunos de los siguientes síntomas: fiebre, dolor faríngeo, tos, rinorrea, náuseas, vómito, diarrea, cefalea y/o dolor ocular[41]. Del total, veintiuno fueron confirmados como positivos para la infección por influenza A(H1N1) por RT-PCR, y trece fueron confirmados como negativos. La edad media de los pacientes cuya infección fue confirmada como positiva fue 34 años. Como dato importante, ninguno de los pacientes dentro del protocolo falleció.

El grupo de controles consistió en 9 individuos sanos, seis mujeres y tres hombres, en un rango de 22 a 60 años de edad. Ninguno de ellos tenía antecedentes de haber padecido un cuadro clínico semejante a influenza, con alguno de los síntomas descritos anteriormente.

10.2. Los pacientes infectados con el virus de influenza humana pandémica A(H1N1) 2009 muestran mayores títulos de anticuerpos que los controles sanos.

Se contaba con todos los pacientes que habían cumplido con los criterios de inclusión al protocolo. El diagnóstico se realizó por el departamento de Biología Molecular del Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (InDRE) posterior al ingreso del paciente. Dicho diagnóstico se realizó por rRT-PCR, según como lo marcó el protocolo del Centro para el Control de Enfermedades de Atlanta (*Centers for Disease Control and Prevention, CDC*) en su versión de Abril 2009 para la detección y caracterización de influenza de origen porcino. Brevemente, la prueba parte de RNA extraído a partir de una muestra de exudado faríngeo del paciente, durante la prueba de rRT-PCR se obtiene el cDNA (DNA complementario) y se amplifica empleando diferentes iniciadores y sondas, los cuales fueron diseñados para la detección universal de todos los tipos de influenza A, así como todos los virus de influenza A porcina reportados hasta la fecha y, específicamente, el virus de influenza A porcina subtipo H1. La muestra se

consideró positiva para influenza A humana pandémica 2009 si las curvas de reacción tanto para la prueba de influenza A como el respectivo subtipo (Influenza A porcina o influenza A H1), cruzaban la línea umbral en 40 ciclos. Si no ocurría lo mismo con el ensayo para detectar influenza A, la muestra se consideró negativa.[42]

Una vez obtenidos los datos de confirmación del diagnóstico de infección por el virus de influenza A(H1N1), del grupo de enfermos se tomaron los pacientes que fueron confirmados con infección positiva por influenza pandémica 2009. Se hizo una comparación entre los controles sanos y se observó un aumento en el título de anticuerpos en los pacientes positivos para influenza A pandémica con respecto a los individuos sanos, siendo éste estadísticamente significativo ($P < 0.05$) (Fig. 3). Los títulos de anticuerpos se expresaron en logaritmo base 10, por lo que las gráficas muestran los resultados individuales y la media geométrica con su respectivo intervalo de confianza al 95%.

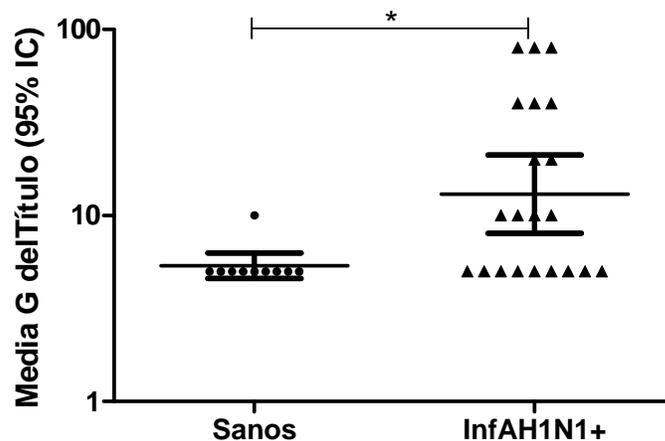


Figura 1. Los pacientes con diagnóstico confirmado de influenza A(H1N1) muestran mayores títulos de anticuerpos que los individuos sanos. Se determinaron los títulos de anticuerpos contra el virus de influenza A/México/4482/2009(H1N1) en controles sanos y pacientes que fueron confirmados con infección positiva (InfAH1N1+) utilizando el método de inhibición de la hemoaglutinación. ** $P < 0.05$ utilizando la prueba de Mann-Whitney.

10.3. Existen altos títulos de anticuerpos contra las cepas *A/Swine/Iowa/00239/2004(H1N1)* y *A/Swine/Texas/4199-2/98(H3N2)* tanto en controles sanos como en individuos enfermos.

Se decidió determinar los títulos de anticuerpos contra los virus de influenza porcinos *A/Swine/Iowa/00239/2004(H1N1)* y *A/Swine/Texas/4199-2/98(H3N2)* por inhibición de la hemoaglutinación. Esto se realizó con los sueros de pacientes con infección confirmada, tanto positivos como negativos, y los controles sanos. Estos títulos se compararon con los títulos contra la cepa pandémica. Se obtuvo que los títulos de anticuerpos contra ambas cepas porcinas son mayores en todos los grupos con respecto a los títulos contra la cepa pandémica, y que esta diferencia es estadísticamente significativa ($P < 0.001$). Por otra parte, los títulos de anticuerpos contra el virus porcino H1N1/Iowa son ligeramente menores que los anticuerpos contra el virus porcino H3N2/Texas en todos los grupos. Sin embargo, entre los grupos comparados no se encontró diferencia significativa en los títulos de anticuerpos contra los virus porcinos.

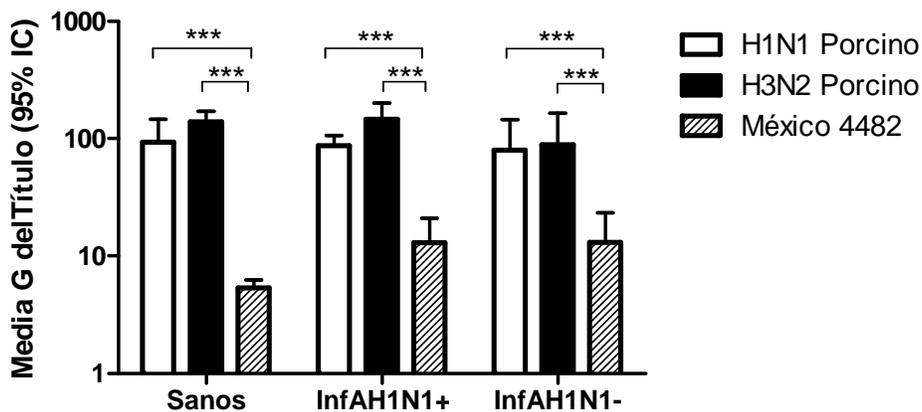


Figura 2. Existen anticuerpos contra las cepas *A/Swine/Iowa/00239/2004(H1N1)* y *A/Swine/Texas/4199-2/98(H3N2)* tanto en controles sanos como en individuos enfermos. Se muestran los títulos de anticuerpos contra las cepas *A/Swine/Iowa/00239/2004(H1N1)* (H1N1 Porcino), *A/Swine/Texas/4199-2/98(H3N2)* (H3N2 Porcino) y *A/México/4482/2009* (México 4482) en individuos sanos y pacientes con infección confirmada como positivos (InfAH1N1+) o negativos (InfAH1N1-). Se analizaron los títulos de anticuerpos empleando la técnica de inhibición de la hemoaglutinación. $P < 0.001$ utilizando la prueba de Mann-Whitney.

10.4. *La cepa de influenza A/México/4482/2009 posee una alta identidad en comparación con la A/California/04/2009.*

Ya que se contaba con la disponibilidad del virus de influenza A/México/4482/2009(H1N1), se consideró emplearlo como antígeno en la prueba de inhibición de la hemoaglutinación. Esta cepa fue aislada de un paciente del InDRE con influenza A humana pandémica 2009. Sin embargo, la cepa de referencia para el virus de influenza A humana pandémica 2009 es A/California/04/2009. De tal forma que se realizó un alineamiento entre las hemaglutininas de estas cepas, para evaluar si la identidad con la cepa de referencia era lo suficientemente alta para emplearla en la titulación de los sueros. Se detectó que la secuencia de aminoácidos correspondiente a la hemaglutinina del virus de influenza A/México/4482/2009 difiere en tres aminoácidos con respecto a la cepa A/California/04/2009, los cuales corresponden a: una serina por una prolina en la posición 30, una alanina por una treonina en la posición 144, y una valina por una isoleucina en la posición 268. Esto representa el 99.4% de identidad entre ambas proteínas. El alineamiento estructural dio como resultado que hay un 96% de similitud estructural entre las proteínas, por lo que se decidió emplear la cepa viral disponible para los análisis de los sueros.

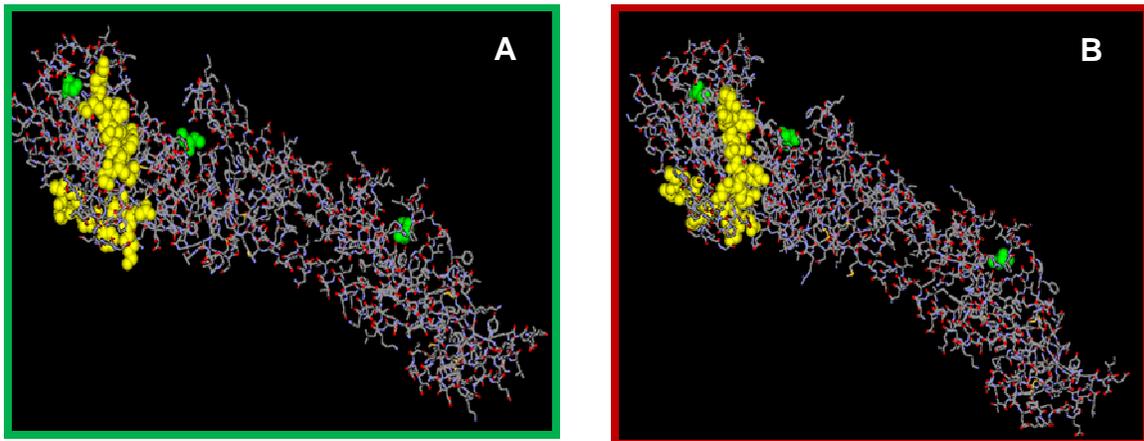


Figura 3. **La cepa de influenza A/México/4482/2009 posee una alta identidad en comparación con la A/California/04/2009.** Se muestra la estructura molecular de la hemaglutinina correspondientes a las cepas de influenza A/México/4482/2009 (A) y A/California/04/2009 (B). En color verde se indican los aminoácidos que varían entre una cepa y otra. En color amarillo se resalta el sitio de unión a receptor de la proteína.

10.5. La hemaglutinina de la cepa de influenza porcina A/Swine/Iowa/00239/2004(H1N1) tiene regiones antigénicas altamente conservadas entre la cepa A/México/4489/2009(H1N1).

Por el origen porcino del virus de influenza causante de la pandemia 2009, se deseaba averiguar si en los pacientes existían anticuerpos dirigidos contra virus porcinos. Para esto, era necesario averiguar si existían epitopos compartidos entre las cepas A/Swine/Iowa/00239/2004(H1N1) y A/México/4482/2009. La predicción de epitopos se realizó empleando la herramienta ElliPro de la Base de Datos de Epitopos y Recursos de Análisis. Se detectaron los epitopos lineales presentes en la hemaglutinina de la cepa porcina, y estos fueron comparados con la secuencia de la cepa de influenza humana. Se detectaron 14 epitopos lineales, de longitud variable. El grado de identidad entre las cepas es alto, variando desde 70% hasta 100% (Tabla 1). La mayoría de los epitopos predichos se encuentran en la cabeza de la hemaglutinina, cercanos al sitio de unión a receptor de la proteína.

No.	Posición de inicio	Posición de termino	Péptido	Número de residuos	Identidad
1	463	517	YEKVRSQKLNNAKEIGNGCFEFYHKCDN TCMESVKNGTYDYPKYSEEAKLNREEI	55	100.00%
2	251	263	IEPGDTITFEATG	13	84.62%
3	169	190	VKKGNSYPKLSKSYINNKKEV	22	90.91%
4	369	379	HHQNEQGSGYA	11	100.00%
5	199	242	PPTSTDQQTLYQNADAYVFGSSKYSK RFKPEIAARPKVRDQAG	44	84.09%
6	16	20	DADTL	5	80.00%
7	35	40	TVLEKN	6	100.00%
8	337	356	NIPSIQSRGLFGAIAAGFIEG	20	95.00%
9	415	427	SQLEKRIESLNNK	13	69.23%
10	131	164	FEIFPKANSWPNHDTNKGVTAACPYAGA SSFYRN	34	82.35%
11	27	30	NNST	4	100.00%
12	81	87	NPECESL	7	100.00%
13	358	364	WTGMIDG	7	85.71%
14	100	107	PNSDNGTC	8	75.00%

Tabla 1. Conservación de epitopos lineales presentes en la hemaglutinina de la cepa A/Swine/Iowa/00239/2004(H1N1). Las secuencias se compararon contra la cepa A/México/4482/2009, cuya identidad se expresó en porcentaje.

10.6. La hemagglutinina de la cepa porcina A/Swine/Texas/4199-2/98(H3N2) posee regiones antigénicas conservadas respecto a la cepa de influenza estacional A/Brisbane/10/2007(H3N2).

Otro punto importante a evaluar en este rubro es si los pacientes analizados en este estudio también poseían anticuerpos contra el subtipo H3N2, el cual es una cepa que circula comúnmente en humanos durante las epidemias estacionales. No obstante, sólo se contaba con la cepa A/Swine/Texas/4199-2/98(H3N2), por lo que se evaluó la identidad de los epitopos presentes en esta cepa con los epitopos de la cepa estacional del periodo 2008-2009 A/Brisbane/10/2007(H3N2) para determinar si podía emplearse en el ensayo de inhibición de la hemoaglutinación.

Primero se realizó un alineamiento de secuencias entre las hemagglutininas de ambas cepas, dando como resultado un 87,09% de identidad entre ellas. Posteriormente, se predijeron los epitopos lineales presentes en la cepa porcina y se buscó la conservación de ellos en la secuencia de la cepa estacional. La predicción arrojó que existen 8 epitopos presentes en la HA de la cepa A/Swine/Texas/4199-2/98(H3N2), y que estos se conservan en la cepa estacional H3N2, variando el grado de identidad desde 50% hasta 100% (Tabla 2). Esto indica un grado de conservación de epitopos aceptable, por lo que se decidió emplear la cepa H3N2 porcina para el análisis.

No.	Posición de inicio	Posición de termino	Péptido	Número de residuos	Identidad
1	264	329	TGMRNVPEKQTRGIFGAIAGFIENGWEGMV DGWYGFRHQNSEGTGQAADLKSTQAAIDQ VNGKLNK	66	96.97%
2	346	359	SEVEGRIQDLEKYV	14	100.00%
3	183	192	VKPGDILLIS	10	90.00%
4	131	139	PSTDSEQTS	9	44.44%
5	101	122	HKLEYKYPALNVTMPNNDKFDK	22	77.27%
6	142	174	VQAIGRVTVSTKSSQQTVIPNIGSRPWVIRGI SS	33	78.79%
7	67	93	TNEDFNWTGVAQDGGYSCKRGSVKSF	27	59.26%
8	220	223	IDNC	4	50.00%

Tabla 2. Conservación de epitopos lineales presentes en la hemaglutinina de la cepa de influenza A/Swine/Texas/4199-2/98(H3N2). **Las secuencias se compararon contra la hemaglutinina de la cepa de influenza estacional 2008-2009 A/Brisbane/10/2007.**

11. DISCUSIÓN

En el presente trabajo se realizó un estudio de la respuesta de anticuerpos en pacientes infectados con el virus de influenza pandémica A(H1N1) 2009, que se desató en los meses de abril-mayo de 2009. A pesar de que el título de este trabajo hace referencia al periodo mencionado anteriormente, el número de pacientes incluidos era apenas de 15, por lo que se amplió el tiempo de captación de pacientes hasta el mes de diciembre de 2009, con lo que se aumentó el número a 34. Según el cálculo estadístico para el tamaño de la muestra, el protocolo se diseñó para que ésta incluyera al menos 37 pacientes por grupo. Desafortunadamente, el número de pacientes totales captados no cumplió con el cálculo estadístico. Pero para explicar esto es necesario contextualizar la situación en los sistemas de salud durante el periodo inicial de la pandemia.

Cuando se emitió la alerta sanitaria el 16 de abril, se indujo en la población un estado de pánico, y cualquier enfermedad respiratoria parecida a influenza era motivo para acudir a recibir atención médica, lo que provocó la saturación de los servicios de salud. Los pacientes con sospecha de enfermedad respiratoria eran ingresados, y la toma de muestra se enfocaba principalmente al diagnóstico confirmatorio de la infección a partir de un exudado faríngeo. No obstante, el desconocimiento de la virulencia y peligrosidad de este nuevo virus complicó el acceso a los pacientes por las medidas de seguridad que esto implicaba (Los pacientes eran aislados y los médicos tenían que acceder a las áreas con trajes de bioseguridad en horarios restringidos) de tal manera que reunir el número de muestras planeadas fue una labor ardua y difícil de lograr.

Entonces, en los pacientes que logramos reunir se buscó la presencia de anticuerpos contra el virus pandémico. En el grupo de pacientes infectados con influenza pandémica 2009 se observó un aumento en el título, la cual fue estadísticamente significativa respecto al grupo control. No obstante, dentro de este grupo de pacientes se encontraron individuos en los cuales no se detectaron anticuerpos contra el virus en cuestión. Esto puede deberse a que la toma de muestra de estos pacientes se realizó apenas de 1 a 2 días después del inicio de

los síntomas. Se ha reportado que los anticuerpos en vía sistémica comienzan a detectarse después de 4 a 5 días del inicio de la infección[32]. La presencia de anticuerpos durante la infección por el virus de influenza se considera como un marcador de sobrevivencia[2], ya que están dirigidos principalmente contra la hemaglutinina y neuraminidasa, ejerciendo efectos sobre la liberación y propagación virales[32]. Considerando que ninguno de los pacientes falleció, podría correlacionarse la presencia de estos anticuerpos con el proceso de recuperación de la enfermedad. Sin embargo, sería necesario analizar muestras de pacientes que sí fallecieron para comprobar esta hipótesis.

En el grupo de pacientes cuya infección por virus de influenza A(H1N1) pandémica fue negativa también se detectaron anticuerpos. De hecho, no se encontró diferencia estadísticamente significativa respecto al título de anticuerpos contra la cepa pandémica A(H1N1) 2009 entre los grupos de pacientes diagnosticados como positivos y negativos. Este hecho resulta complicado de explicar, ya que se ha reportado que la reactividad cruzada de los anticuerpos contra virus de influenza estacionales previos y el nuevo virus pandémico 2009 es mínima[43]. Sin embargo, también es probable que estos anticuerpos sean producto de una infección por un virus de influenza A co-circulante durante la epidemia. Aunado a esto, la prueba confirmatoria se enfocó únicamente al diagnóstico de la infección por virus de influenza humana pandémica 2009. Desafortunadamente, los resultados proporcionados por el InDRE son absolutos y no detallan si estos pacientes que resultaron negativos sí estaban infectados con algún subtipo de influenza A. Ante esto, se propone analizar los sueros de los pacientes empleando cepas virales de influenza A humana estacionales que correspondan al mismo periodo en el cual ocurrió la pandemia, de tal manera que se pueda comprobar la hipótesis planteada.

Como se mencionó antes, el origen del virus causante de la pandemia es porcino. Por esto, se buscaron anticuerpos contra el virus porcino H1N1/lowa. Se encontró que tanto en el grupo de pacientes como en los controles sanos hay anticuerpos contra esta cepa porcina, sin existir diferencia significativa entre los grupos. Lo

mismo ocurrió con el virus porcino H3N2/Texas, en donde se observan altos títulos. La mayoría de los títulos se encuentran por arriba del valor considerado protector para influenza A humana pandémica 2009, el cual es 1:40[43].

En un estudio retrospectivo en el que se analizó la seroprevalencia contra el nuevo virus del 2007 al 2009, se encontró que no existían anticuerpos contra el virus pandémico, sino hasta después de abril del 2009, cuando comenzó a circular en la población[44]. A pesar de esto, en el mismo estudio se encontró que sí existen anticuerpos contra las cepas porcinas H1N1/Iowa y H3N2/Texas, aún antes del 2009 (Datos no publicados). Además, en un estudio realizado en los hospitales del IMSS con pacientes infectados con el virus de influenza pandémica A(H1N1) 2009 se observó una mejor evolución clínica en aquellos que habían reportado ser vacunados por influenza estacional el año anterior[45], por lo cual se planteó que podría existir reactividad cruzada entre los anticuerpos inducidos por la vacunación del año anterior contra el virus pandémico. Juntos, estos hallazgos que a pesar de encontrarse anticuerpos contra los subtipos virales H1N1 y H3N2 en valores considerados protectores, estos anticuerpos no fueron suficientes para mediar la protección contra el virus de influenza pandémica A(H1N1) 2009.

La titulación de los sueros se realizó por inhibición de la hemoaglutinación. Esta técnica emplea el virus contra el cual se buscan los anticuerpos como antígeno. En muchas publicaciones relacionadas con la pandemia de influenza 2009 la cepa de referencia es A/California/04/2009(H1N1)[43, 46-47]. Esta cepa fue aislada del primer paciente reportado en Estados Unidos con influenza pandémica 2009[47]. Sin embargo, para el análisis de los sueros se contaba con la cepa A/México/4482/2009(H1N1). Ya que el fenómeno de la hemoaglutinación está mediado por la interacción de la hemaglutinina del virus de influenza con los residuos de ácido siálico presentes en la membrana de los eritrocitos con los que se ponen en contacto, se decidió evaluar la identidad de la hemaglutinina entre los dos virus. La comparación de la secuencia de aminoácidos de la hemaglutinina correspondiente a la cepa de referencia con la hemaglutinina de la cepa A/México/4482/2009(H1N1) reveló una diferencia de tan solo 3 aminoácidos.

Estructuralmente, ambas cepas también tienen un alto grado de identidad. Esto resulta congruente con el hecho de que ambas cepas pertenecen al mismo grupo en un cladograma realizado recientemente en donde se ilustra la filogenética de este nuevo virus causante de la pandemia[48]. Se sabe que los anticuerpos que reconocen el sitio de unión a receptor de la hemaglutinina inhiben la hemoaglutinación[32, 49]. Ya que ninguno de los aminoácidos variantes se encontraba en el sitio de unión a receptor, y la identidad entre las cepas era alta, se aceptó el uso de esta cepa viral en el análisis de los sueros.

Por otra parte, la predicción y conservación de epitopos del virus porcino H1N1/Iowa reveló que existe una alta identidad entre esta cepa y la A/México/4482/2009(H1N1). Esto resulta concorde con el hecho de que el virus causante de esta pandemia surgió de un virus porcino H1N1 cuyos segmentos génicos se adaptaron para la transmisión en humanos[50][51].

Además, se deseaba averiguar si existían anticuerpos contra el subtipo de influenza H3N2, ya que es un virus circulante en humanos durante las temporadas estacionales[1]. Sin embargo, sólo se contaba con la cepa porcina A/Swine/Texas/4199-2/98(H3N2). Considerando que el uso de esta cepa requiere un menor riesgo durante el análisis de los sueros, se decidió evaluar si el uso del virus porcino H3N2/Texas podía darnos un acercamiento de la presencia de anticuerpos en los grupos analizados, por lo que se compararon los epitopos del virus porcino H3N2/Texas con la cepa vacunal estacional A/Brisbane/10/2007(H3N2). En este análisis se encontró un epitopo con bajo grado de identidad, apenas 44%. Sin embargo, este epitopo se encuentra en la parte del tallo de la hemaglutinina. Ya que no se han reportado anticuerpos contra esta región de la proteína, no se consideró este epitopo[32]. Los demás se encontraron en la parte globular de la hemaglutinina, donde se encuentran los sitios antigénicos más importantes de la proteína[4, 32]. La identidad de estos epitopos entre la cepa porcina y la estacional humana alcanzó hasta el 100%. Por lo tanto, se aceptó el uso de la cepa porcina H3N2 para obtener un acercamiento de los anticuerpos contra virus H3N2 en los grupos analizados.

Finalmente, este trabajo es un ejemplo más de la aplicación de la ciencia en la resolución de un problema que requería una respuesta inmediata. También es una pequeña parte de una labor conjunta entre virólogos, biólogos moleculares y compañeros inmunólogos en el que se trata de aprender acerca de la biología de este virus, caracterizar el fenómeno inflamatorio ante la infección [52], así como la seroprevalencia en la población mexicana y el desarrollo de vacunas que nos ayuden a combatir esta pandemia.

11. CONCLUSIONES

El virus de influenza humana pandémica A(H1N1) 2009 es altamente inmunogénico, induce altos títulos de anticuerpos de manera temprana durante la infección en los pacientes. En una persona sana se encontró título de anticuerpos lo que indica la posibilidad de que se genere inmunidad de grupo. No se observó protección cruzada debida a la exposición previa con otros virus de influenza con identidad con el virus pandémico como son el virus porcino H1N1/Iowa y H3N2/Texas.

11.REFERENCIAS

1. Nicholson, K.G., J.M. Wood, and M. Zambom, *Influenza*. Lancet, 2003. **362**: p. 1733-1745.
2. Hilleman, M.R., *Realities and enigmas of human viral influenza: pathogenesis, epidemiology and control*. Vaccine, 2002. **20**: p. 3068–3087.
3. Palese, P. and M. Shaw, *Orthomyxoviridae: the viruses and their replication.*, in *Fields virology*, H.P. Knipe DM, Editor. 2007, Lippincott Williams &Wilkins: Philadelphia.
4. Bouvier, N.M. and P. Palesea, *The biology of influenza viruses*. Vaccine, 2008. **26S**: p. D49-D53.
5. Salomon, R. and R.G. Webster, *The influenza virus enigma*. Cell, 2009. **136**(3): p. 402-10.
6. Ahmed, R., M. Oldstone, and P. Palese, *Protective immunity and susceptibility to infectious diseases: lessons from the 1918 influenza pandemic*. Nature Immunology, 2007. **8**(11): p. 1188–1193.
7. Miller, M.A., et al., *The signature features of influenza pandemics-- implications for policy*. N Engl J Med, 2009. **360**(25): p. 2595-8.
8. Varki, A., et al., *Essentials in Glycobiology*, M.E. Etzler, Editor. 2008, Cold Spring Harbor Laboratory Press: New York.
9. Martin, K. and A. Helenius, *Transport of incoming influenza virus nucleocapsids into the nucleus*. Journal of Virology, 1991. **65**(1): p. 232-244.
10. Derlet, R., et al. *Influenza*. [cited 2009 27-4-2009].
11. Kuiken, T. and J.K. Taubenberger, *Pathology of human influenza revisited*. Vaccine, 2008. **26 Suppl 4**: p. D59-66.
12. Aldridge, J.R., Jr., et al., *TNF/*i*NOS-producing dendritic cells are the necessary evil of lethal influenza virus infection*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(13): p. 5306-11.
13. Liu, Y.J., *IPC: professional type 1 interferon-producing cells and plasmacytoid dendritic cell precursors*. Annu Rev Immunol, 2005. **23**: p. 275-306.
14. Lopez, C.B., et al., *TLR-independent induction of dendritic cell maturation and adaptive immunity by negative-strand RNA viruses*. J Immunol, 2004. **173**(11): p. 6882-9.

15. Kaisho, T. and S. Akira, *Toll-like receptor function and signaling*. The Journal of allergy and clinical immunology., 2006. **117**(5): p. 979-987.
16. Ehrhardt, C., et al., *Interplay between influenza A virus and the innate immune signaling*. Microbes and Infection, 2009: p. 1-7.
17. Pichlmair, A., et al., *Activation of MDA5 requires higher-order RNA structures generated during virus infection*. J Virol, 2009. **83**(20): p. 10761-9.
18. Takeuchi, O. and S. Akira, *Innate immunity to virus infection*. Immunol Rev, 2009. **227**(1): p. 75-86.
19. Choi, M.K., et al., *A selective contribution of the RIG-I-like receptor pathway to type I interferon responses activated by cytosolic DNA*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(42): p. 17870-5.
20. Ludwig, S., et al., *Ringling the alarm bells: signalling and apoptosis in influenza virus infected cells*. Cell Microbiology, 2006. **8**: p. 375-386.
21. Ichinohe, T., et al., *Inflammasome recognition of influenza virus is essential for adaptive immune responses*. Journal of Experimental Medicine, 2009. **206**: p. 79-87.
22. Dzionek, A., et al., *BDCA-2, a novel plasmacytoid dendritic cell-specific type II C-type lectin, mediates antigen capture and is a potent inhibitor of interferon alpha/beta induction*. J Exp Med, 2001. **194**(12): p. 1823-34.
23. Gondois-Rey, F., et al., *Hepatitis C virus is a weak inducer of interferon alpha in plasmacytoid dendritic cells in comparison with influenza and human herpesvirus type-1*. PLoS One, 2009. **4**(2): p. e4319.
24. Kadowaki, N., et al., *Natural interferon alpha/beta-producing cells link innate and adaptive immunity*. J Exp Med, 2000. **192**(2): p. 219-26.
25. Mozdzanowska, K., et al., *A pulmonary influenza virus infection in SCID mice can be cured by treatment with hemagglutinin-specific antibodies that display very low virus-neutralizing activity in vitro*. Journal of Virology, 1997. **71**: p. 1906-1910.
26. Doherty, P., et al., *Effector CD4+ and CD8+ T-cell mechanisms in the control of respiratory virus infections*. Immunological Reviews, 1997. **159**(105-117).
27. Gerhard, W., et al., *Role of the B-cell response in recovery of mice from primary influenza virus infection*. Immunological Reviews, 1997. **159**: p. 95-103.

28. Palladino, G., et al., *Virus Neutralizing antibodies of immunoglobulin G (IgG) but not IgM or IgA isotypes can cure influenza virus pneumonia in SCID mice*. Journal of Virology, 1995. **61**(1851-1854).
29. Brandtzaeg, P., *Overview of the mucosal immune system*. Current Topics in Microbiology and Immunology, 1989. **146**: p. 13-27.
30. Novak, M., et al., *Ig-secreting and interferon-gamma-producing cells in mice mucosally immunized with influenza virus*. Adv Exp Med Biol, 1995. **371B**: p. 1587-90.
31. Epstein, S., et al., *Beta 2-microglobulin-deficient mice can be protected against influenza infection by vaccination with vaccinia-influenza recombinants expressing hemagglutinin and neuraminidase*. Journal of Immunology, 1993. **150**(5484-5493).
32. Gerhard, W., *The role of the antibody response in influenza virus infection*. Curr Top Microbiol Immunol, 2001. **260**: p. 171-90.
33. Iwasaki, T. and T. Nozima, *Defense mechanisms against primary influenza virus infection in mice. I. The roles of interferon and neutralizing antibodies and thymus dependence of interferon and antibody production*. Journal of Immunology, 1977. **118**: p. 256-263.
34. Edgar, R.C., *MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput*. Nucleic Acids Res, 2004. **32**(5): p. 1792-7.
35. Pieper, U., et al., *MODBASE, a database of annotated comparative protein structure models and associated resources*. Nucleic Acids Res, 2009. **37**(Database issue): p. D347-54.
36. Vita, R., et al., *The immune epitope database 2.0*. Nucleic Acids Res, 2010. **38**(Database issue): p. D854-62.
37. Ponomarenko, J., et al., *ElliPro: a new structure-based tool for the prediction of antibody epitopes*. BMC Bioinformatics, 2008. **9**: p. 514.
38. Assarsson, E., et al., *Immunomic analysis of the repertoire of T-cell specificities for influenza A virus in humans*. J Virol, 2008. **82**(24): p. 12241-51.
39. *World Medical Association Declaration of Helsinki*. 1989, World Health Assembly.
40. Armonización., C.D.d.I.C.I.d., *Normas de Buenas Prácticas Clínicas*. 1996.
41. Cunha, B.A., *The clinical diagnosis of severe viral influenza A*. Infection, 2008. **36**(1): p. 92-3.

42. CDC Protocol of realtime RT-PCR for swine influenza A(H1N1). 2009, World Health Organization: Atlanta.
43. Hancock, K., et al., *Cross-Reactive Antibody Responses to the 2009 Pandemic H1N1 Influenza Virus*. New England Journal of Medicine, 2009. **361**: p. 1-8.
44. Núñez Valencia, A., *Estudio retrospectivo de la seroprevalencia contra el virus de influenza A(H1N1) en población mexicana, de 2007 a 2009*. 2010, Universidad Nacional Autónoma de México: México, D.F. p. 34.
45. Echevarría-Zuno, S., et al., *Infection and death from influenza A H1N1 virus in Mexico: a retrospective analysis*. Lancet, 2009. **374**(9707): p. 2072-2079.
46. Zhu, F.-C., et al., *A Novel Influenza A (H1N1) Vaccine in Various Age Groups*. New England Journal of Medicine, 2009. **361**: p. 1-10.
47. Dawood, F.S., et al., *Emergence of a novel swine-origin influenza A (H1N1) virus in humans*. N Engl J Med, 2009. **360**(25): p. 2605-15.
48. Garten, R.J., et al., *Antigenic and genetic characteristics of swine-origin 2009 A(H1N1) influenza viruses circulating in humans*. Science, 2009. **325**(5937): p. 197-201.
49. Deem, M.W. and K. Pan, *The epitope regions of H1-subtype influenza A, with application to vaccine efficacy*. Protein Eng Des Sel, 2009. **22**(9): p. 543-6.
50. Peiris, J.S., L.L. Poon, and Y. Guan, *Emergence of a novel swine-origin influenza A virus (S-OIV) H1N1 virus in humans*. J Clin Virol, 2009. **45**(3): p. 169-73.
51. Michaelis, M., H.W. Doerr, and J. Cinatl, Jr., *An Influenza A H1N1 Virus Revival - Pandemic H1N1/09 Virus*. Infection, 2009.
52. Valero Pacheco, P.N., *Caracterización fenotípica de células mononucleares de sangre periférica durante el fenómeno inflamatorio agudo en pacientes infectados por el virus de influenza humana A(H1N1) durante el brote inicial de abril-mayo 2009*. , in *Facultad de Química*. 2010, Universidad Nacional Autónoma de México: México, D.F. p. 54.